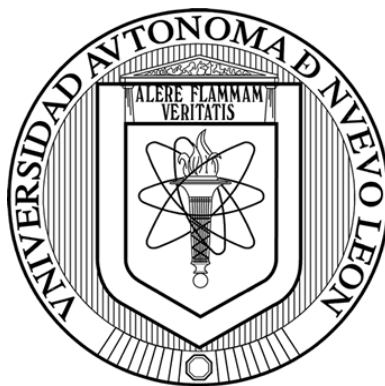


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES TÓXICAS DEL PÉPTIDO A β (25-35) Y
SUS MUTANTES EN CULTIVO CELULAR**

Por

LBT JOSÉ ALEJANDRO CERNA ORNELAS

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS
con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética**

Agosto, 2018

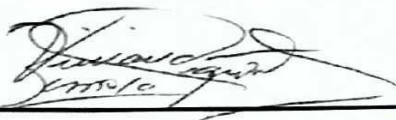
**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES TÓXICAS DEL PÉPTIDO A β (25-35) Y
SUS MUTANTES EN CULTIVO CELULAR**

Aprobación de la tesis:




DRA. C. HERMINIA GPE. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ

Directora de tesis



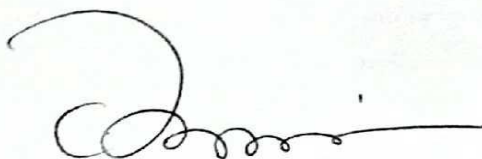
DRA. C. VIVIANA CHANTAL ZOMOSA SIGNORET

Co-Directora de tesis



DR. C. ANTONIO ALÍ PÉREZ MAYA

Miembro de la comisión



DR. MED. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ

Subdirector de Estudios de Posgrado

LUGAR DE TRABAJO Y FINANCIAMIENTO

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Estructural, perteneciente al Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL, bajo la dirección de la Dra. C. Herminia Gpe. Martínez Rodríguez y la co-dirección de la Dra. C. Viviana C. Zomosa Signoret, y se contó con el apoyo del Dr. C. Antonio Alí Pérez Maya, como miembro de la comisión. Este proyecto fue financiado por parte de CONACYT CB 2013 220006 y fue aprobado por el comité de ética de esta facultad con el siguiente número: BI13-007.

COLABORACIONES

Se contó con las siguientes colaboraciones: Dr. C. Román Vidal Tamayo Ramírez, perteneciente al Departamento de Ciencias Básicas, UDEM; Dr. C. Donato Valdés Pérez, del Departamento de Telecomunicaciones, IPN; Dr. C. Jaime Ruíz García, del Instituto de Física, UASLP; Dra. C. Aracely García García, del Departamento de Histología de la Facultad de medicina; Dr. C. Alberto Camacho Morales y Dr. C. Carlos Córdova Fletes, pertenecientes al Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT y a la facultad de medicina por las facilidades prestadas para la realización de este trabajo. A mi comisión de tesis por la paciencia y el tiempo dedicados a mi enseñanza, por mostrarme una parte de su conocimiento y cariño por la ciencia, por servir de ejemplo y por sus opiniones sobre mi trabajo, que me ayudaron a seguir avanzando.

Al personal del departamento de bioquímica y medicina molecular, a Juany, Ariadna, Lulú y Angie, por siempre tener una sonrisa y un comentario agradable para mí, por tratar de ayudar a todos, aun cuando no todo es parte de su trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Ana Estrada, Álex, Ana Miriam y Xico; por ayudarme cuando lo necesité, por formar parte de este equipo. A mis compañeros de terapia celular por casi adoptarme (no les di opción) y a Robbi, por sus respuestas cuando tenía dudas sobre información que conocen más que yo.

A los amigos que me enseñaron la ciudad y se divertieron conmigo, a mis químicos preferidos: Sara y Veracruz. A mis amigos en Aguascalientes, por celebrar conmigo cada meta y alegrar mis visitas, son 'lavanda' más asombrosa.

A mi familia putativa: Florencia, Tita y Stephen; por recibirme cuando al fin pude alcanzarlos y por estar conmigo cuando lo he necesitado, porque hablar con ustedes sobre cualquier cosa me hace bien. A Edwin, Aidé, Juan, Ana Itzel y Frecia, por llegar a esta 'familia disfuncional', por permitirme conocerlos y quererlos. A Abraham, por cada palabra de aliento, por cada comentario que me hizo reír a carcajadas, por hacer todo para conocerme y mostrar interés en mi bienestar, eres especial para mí.

A Moni, por apoyarme y empujarme a salir de mi zona de comodidad, porque fuiste tú quien me dejó ver que puedo confiar y dejarme querer, gracias. A Nancy, nunca pensé que esta amistad durara tanto, sin ti hubiera sido más difícil mi cambio de ciudad. A Cridty, mi prima y compañera desde que tengo memoria, porque crecer junto a ti fue el regalo más hermoso que pude recibir, por ser un ejemplo de fortaleza, por estar para mí y por ser mi mejor amiga.

A mis padres, porque su apoyo ha sido fundamental, por dejarme crecer y no quitarme las alas, porque, aunque no siempre tenemos los mismos puntos de vista, siempre han estado presentes para mí y me guían. Gracias por dejarme tener mascotas, porque así ese niño ensimismado que fui no se sintió solo, y mi gusto por la naturaleza y la ciencia creció. Por soportar mi terrible adolescencia y la de mis hermanos, agradezco profundamente todo lo que hicieron por nosotros, los amo y les dedico esta tesis.

A mis hermanos: Pepe y Cinthia, por estar presentes, por su apoyo y mensajes a distancia, porque crecer con ustedes me hizo más fuerte, por los 'golpes con cariño' y los: "¡no le digas a mi mamá!"; por cuidarme y permitirme cuidarlos. Gracias Pepe, por el sobrino tan carismático, que con verlo hace notar el amor que su familia le tiene.

Al resto de mi familia, porque como buena familia mexicana, crecí rodeado de primos y tíos que formaron parte de mi desarrollo personal, por los valores que me fueron inculcados con ello.

Milan Kundera escribió: "el amor, por definición, es un regalo no merecido"; y no puedo sentirme más bendecido por este regalo, gracias por formar parte de mi vida, por cada cosa aprendida, todos ustedes han tenido un papel en mi desarrollo que sirvió de cimiento para que este trabajo pudiera llevarse a cabo.

DEDICATORIA

A mis padres, a mis hermanos y a mis 'cabecitas de algodón' preferidas, su
recuerdo siempre está presente.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Demencia y Enfermedad de Alzheimer	1
1.2 Síntomas	1
1.3 Epidemiología	2
1.4 Clasificación	3
1.4.1 Esporádica	3
1.4.1 Familiar.....	4
1.5 Factores de riesgo	4
1.5.1 Edad	5
1.5.2 Anomalías genéticas relacionadas con la Enfermedad de Alzheimer .	5
1.5.2.1 Gen APP	6
1.5.2.2 Genes PSEN1 y PSEN2	6
1.5.2.3 APOE en Enfermedad de Alzheimer	6
1.5.3 Otros factores de riesgo	7
1.6 Fisiopatología	8
1.6.1 Proteína tau y Ovillos Neurofibrilares	8
1.6.1.1 Ovillos Neurofibrilares	8
1.6.1.2 Proteína tau.....	9
1.6.2 Placas amiloides, APP y péptido A β	9
1.6.2.1 Placas amiloides	9
1.6.2.2 Proteína Precursora del Amiloide (APP)	10
1.6.2.1.1 Procesamiento de APP.....	10
1.6.2.2 Péptido A β	11
1.6.2.2.1 Agregación del péptido A β	12
1.6.2.2.2 Péptido A β (25-35).....	13
1.7 Hipótesis de la Cascada del Amiloide	14
1.8 Alteraciones neuronales causadas por el péptido Aβ	14
1.8.1 Estrés oxidativo	15
1.8.1.1 Oxidación de la Metionina	16
1.8.2 Disfunción mitocondrial	17

1.8.2.1 ROS y disfunción mitocondrial	18
1.8.2.2 A β y Bioenergética	18
1.8.2.3 A β y Dinámica mitocondrial.....	18
1.8.2.4 Formación del mPTP	18
1.8.3 Efectos en la vía de la autofagia	19
1.9 Inhibición de la agregación del péptido Aβ	21
1.9.1 Péptidos basados en la estructura del A β	21
1.10 Antecedentes	22
1.10.1 Antecedente directo.....	23
CAPÍTULO 2	25
JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	25
2.1 Justificación.....	25
2.2 Hipótesis	25
CAPÍTULO 3	26
OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo General	26
3.2 Objetivos Específicos	26
CAPÍTULO 4	27
MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS	27
4.1 Reactivos	27
4.1.1 Solubilización y Agregación de péptidos	27
4.1.2 Cultivo celular	28
4.1.3. Extracción de proteínas y Western Blot.....	28
4.1.4. Efectos sobre la viabilidad y apoptosis.....	29
4.1.5. Efectos sobre la vía de la autofagia.....	29
4.2 Materiales	29
4.2.1 Materiales de uso general	29
4.2.2 Microscopía de fuerza atómica (AFM).....	29
4.2.3 Material biológico	30
4.2.4 Cultivo celular	30
4.3 Equipos	30
4.3.1 Equipos de uso general.....	30

4.3.2 Microscopía de Fuerza Atómica	30
4.3.3 Solubilización y agregación de péptidos.....	31
4.3.4 Cultivo celular	31
4.3.5 Internalización celular y estado de agregación.....	31
CAPÍTULO 5.....	32
MÉTODOS.....	32
5.1 Estrategia general.....	32
5.2 Solubilización y agregación de péptidos	33
5.2 Microscopía de Fuerza Atómica	34
5.3 Internalización celular y estado de agregación	35
5.3.1 Extracción de proteínas.....	36
5.3.2 Western blot y tinción de plata	37
5.3.2.1 Tinción de plata.....	38
5.3.2.2 Western blot	38
5.4 Viabilidad celular	39
5.4.1 Curva de viabilidad	39
5.4.2 Efectos de los péptidos sobre la viabilidad celular	40
5.5 Apoptosis	42
5.6 Vía de autofagia	43
5.6.1 Extracción de proteínas.....	44
5.6.2 Western blot y tinción de plata	44
5.6.2.1 Tinción de plata.....	45
5.6.2.2 Western blot	45
CAPÍTULO 6.....	46
RESULTADOS	46
6.1 Caracterización estructural mediante AFM de A β (25-35) WT y variantes.....	46
6.2 Internalización celular y estado de agregación	48
6.2.1 Curva de calibración de concentración proteica.....	48
6.2.2 Tinción de plata y Western blot	50
6.3 Viabilidad celular	51
6.3.1 Curva de viabilidad	51
6.3.2 Efectos de los péptidos sobre la viabilidad celular	52

6.4 Apoptosis	54
6.5 Vía de autofagia	55
CAPÍTULO 7	58
DISCUSIÓN	58
CAPÍTULO 8	65
CONCLUSIONES	65
CAPÍTULO 9	66
PERSPECTIVAS	66
CAPÍTULO 10	67
BIBLIOGRAFÍA	67

LISTA DE ABREVIATURAS

α7nAChR	Subunidad α que contiene receptor nicotínico de acetilcolina
A30W	Alanina 30 Triptófano
Aβ	β amiloide
AFM	Microscopía de Fuerza Atómica
AICD	Dominio Intracelular de APP
Ala	Alanina
APOE4	Apolipoproteína E 4
APP	Proteína precursora del amiloide
Asp	Aspartato
Atg	Proteína relacionada a autofagia
ATP	Adenosín Trifosfato
Cq	Cloroquina
CTSD	Catepsina D
CypD	Ciclofilina D
Cys	Cisteína
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DE	Desviación estándar
DIAD	Enfermedad de Alzheimer de herencia dominante
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
Drp1	Proteína relacionada a dinamina 1
EA	Enfermedad de Alzheimer
EOAD	Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano
FIP200	Proteína que interactúa con la familia FAK de 200 kDa
Fis1	Proteína de fisión mitocondrial 1
GSK3-β	β - Glicógeno cinasa sintasa 3- β
HFIP	Hexafluoroisopropanol
Ile	Isoleucina
JNKs	Cinasas C-jun N-termilal
K28A	Lisina 28 Alanina

Leu	Leucina
LOAD	Enfermedad de Alzheimer de Inicio tardío
LRP	Proteína relacionada con receptor de lipoproteína de baja densidad
Lys	Lisina
M35C	Metionina 35 Cisteína
MAPK	Proteínas cinasas p38 activadas por mitógeno
Met	Metionina
MetSO	Sulfóxido de Metionina
Mfn	Mitofusina
mGluR5	Receptores metabotrópicos de glutamato
mTORC1	Complejo 1 del blanco de rapamicina en mamíferos
Msrs	Metionina Sulfóxido Reductasas
NFTs	Ovillos neurofibrilares
Nle	Norleucina
NMDAR	Receptor N-metil-D-asparto
OPA1	Dinamina mitocondrial tipo GTPasa 1
PAS	Sitio de formación del fagóforo
PBS	Buffer Fosfato Salino
Phe	Fenilalanina
PS1	Presenilina 1
PS2	Presenilina 2
P75NRT	Receptor de neurotrofina p75
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
R²	Coeficiente de determinación
Ra	Análisis de rugosidad
Rap	Rapamicina
RAPTOR	Proteína relacionada a regulación demTOR
RIPA	Ensayo de precipitación radio-inmune
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
Rot	Rotenona

SFB	Suero Fetal Bovino
TOM	Traslocasa de Membrana Externa
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
ULK1	Cinasa de tipo Unc51 1
URF	Unidad Relativa de Fluorescencia
URL	Unidad Relativa de Luminiscencia
Val	Valina
V₀-ATPasa	ATPasa vacuolar
WT	Wild Type –silvestre

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características patológicas de la EA	8
Figura 2. Procesamiento de APP	11
Figura 3. Agregación de A β	13
Figura 4. Péptido A β (25-35).....	13
Figura 5. Efecto del péptido A β (25-35) sobre el flujo de autofagia	20
Figura 6. Variantes del péptido A β (25-35)	23
Figura 7. Gráficas del efecto sobre la viabilidad celular y producción de ROS con A β (25-35) y variantes.....	24
Figura 8. Estrategia general.....	33
Figura 9. Esquema de la solubilización y agregación de péptidos.....	34
Figura 10. Esquema de la caracterización por AFM	35
Figura 11. Esquema de la extracción de proteínas.....	37
Figura 12. Esquema del western blot.....	39
Figura 13. Esquema de la evaluación del efecto sobre la viabilidad del A β (25-35) WT y variantes.....	41
Figura 14. Esquema de la evaluación del efecto sobre la actividad de caspasas del A β (25-35) WT y variantes	43
Figura 15. Micrografías obtenidas por AFM de agregados del A β (25-35) WT y variantes	47
Figura 16. Curva de calibración Bradford	49
Figura 17. Evaluación la internalización del A β (25-35) WT y variantes y determinación de su estado de agregación	50
Figura 18. Curva de viabilidad	52
Figura 19. Efecto de los distintos péptidos sobre la viabilidad celular a 24 horas	53
Figura 20. Efecto de los péptidos sobre la actividad de caspasas 3/7 a 12 y 24 horas.....	55
Figura 21. Tinciones de plata.....	56
Figura 22. Efecto de los péptidos sobre la vía de autofagia	57

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Secuencia de aminoácidos del péptido A β (25-35) WT y las variantes: A30W, K28A y M35C.	27
Tabla II. Análisis de rugosidad de los agregados formados por el A β (25-35) WT y variantes.....	48
Tabla III. Medias de absorbancia obtenidas para cada punto de la curva con su desviación estándar.	49
Tabla IV. Media de los valores de URL obtenidos para cada punto de la curva con su desviación estándar.	51
Tabla V. Media del número de células por tratamiento con su desviación estándar.....	53

RESUMEN

Estudio de las propiedades tóxicas del péptido A β (25-35) y sus mutantes en cultivo celular

LB. José Alejandro Cerna Ornelas

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Número de páginas: 80

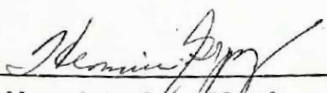
Fecha de Titulación: Julio 2018

Introducción: La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza por la formación de placas compuestas principalmente por el péptido β -amiloide (A β). Este péptido está compuesto por hasta 43 aminoácidos y tiene un papel importante en la EA al causar alteraciones neuronales que conllevan a la muerte celular. Estos efectos se deben a sus propiedades de agregación, dentro de las distintas etapas de agregación son los oligómeros de bajo peso molecular los más relacionados a la aparición y progresión de la EA. La secuencia aminoácida del péptido A β es esencial para su agregación. En este trabajo se utilizó la variante A β (25-35), que contiene un fragmento hidrofóbico implicado en la agregación del péptido A β . Se diseñaron tres mutantes a partir del péptido silvestre, a cada mutante se le hizo un cambio de aminoácido (aa) en diferente posición: A30W, K28A y M35C, con la finalidad de evaluar el papel de dichos aa sustituidos en las propiedades de agregación y toxicidad en cultivo celular.

Métodos: La caracterización estructural de los agregados del péptido A β (25-35) y sus variantes se realizó por microscopía de fuerza atómica (AFM). Dichos agregados también se utilizaron para tratar células de la línea C6 de glioblastoma de rata y evaluar su internalización y efecto sobre la vía de autofagia por western blot, además, se evaluó el efecto sobre la viabilidad y actividad de caspasas efectoras por luminiscencia.

Resultados: En la caracterización por AFM se observaron fibrillas cortas del péptido WT desde tiempos tempranos, así como en la mutante M35C, mientras que las mutantes A30W y K28A formaron agregados con mayor rugosidad y predominaron las estructuras redondas y amorfas, respectivamente. Al evaluar la internalización se observaron bandas pertenecientes a oligómeros de 30-60KDa al tratar con todos los péptidos. En los ensayos de viabilidad no se observaron diferencias significativas al tratar con agregados de los distintos péptidos, mientras que en la actividad de caspasas 3/7 se observó un aumento a las 24h en las mutantes, contrario a lo observado con el WT, pues la actividad fue mayor en un tiempo de 12h. Al evaluar la relación LC3 II/I, que indica la actividad de autofagia, se observó que el WT y la mutante M35C inhiben dicha vía, mientras que las mutantes A30W y K28A la activan.

Conclusiones: Las mutaciones A30W y K28A provocan un efecto distinto sobre las características estructurales de los agregados formados, así como sobre la actividad de caspasas efectoras y vía de autofagia, al comparar con el péptido WT, mientras que la mutante M35C no presentó cambios tan evidentes. Se observó que los agregados oligoméricos de estos péptidos pueden ser citotóxicos por su internalización en las células.


Dra. C. Herminia Gpe. Martínez Rodríguez
Directora de tesis


Dra. C. Viviana C. Zomosa Signoret
Co-directora de tesis

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Demencia y Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo progresivo que afecta áreas del hipocampo y la corteza cerebral, y es la principal causa de demencia. Los síntomas característicos de la demencia son: dificultad en el lenguaje, disminución de la memoria, de la capacidad para resolver problemas y otras habilidades cognitivas. Estos síntomas se deben principalmente al daño causado en neuronas presentes en partes del cerebro involucradas en funciones cognitivas. En la EA el daño eventualmente ocurre también en otras partes del cerebro, incluyendo áreas involucradas en las funciones motoras básicas, como caminar [1]. Es común encontrar cambios iniciales en tejido de los lóbulos temporal y frontal, que progresan lentamente a otras regiones de la neocorteza a tasas que varían considerablemente entre individuos [2].

1.2 Síntomas

Los fallos en la memoria reciente, apatía y depresión son síntomas comunes en las etapas tempranas de la EA. La muerte neuronal que produce estos síntomas, inicia en regiones asociadas a la formación de nuevos recuerdos y conforme progresan los daños a otras regiones aparecen más síntomas. En

etapas más avanzadas incluyen: dificultad para comunicarse, desorientación, confusión, capacidad para juzgar, cambios en el comportamiento; también se presenta dificultad para hablar, tragar y caminar [1].

En etapas más avanzadas los pacientes usualmente pierden la capacidad para comunicarse y necesitan ayuda para llevar a cabo actividades cotidianas como: el aseo personal, comer y utilizar el baño. Conforme se pierde la capacidad motora, los individuos afectados se vuelven más vulnerables a infecciones como neumonía, lo que contribuye al deceso. La capacidad para tragar también se ve afectada cuando se alteran regiones cerebrales encargadas de control de los músculos implicados en dicha acción [1, 2].

1.3 Epidemiología

En 2015, se estimó una prevalencia global de 46.8 millones de personas con demencia y se proyectó que dicha cifra se duplicaría cada 20 años, alcanzando 74.7 millones de casos en el 2030 y 131.5 millones en el 2050. El 58% de las personas con demencia vive en países de bajos y medianos ingresos. La distribución de casos nuevos por región, en 2015, fue de: 4.9 millones en Asia, 2.5 millones en Europa, 1.7 millones en América y 0.8 millones en África. Estas cifras representan un incremento de la proporción de casos nuevos en Asia, América y África, y una disminución en Europa [3].

Las estimaciones de prevalencia de demencia en personas mayores a 60 años van del 4.6% en Europa Central al 8.7% en África del Norte y Medio Este, la estimación para cualquier otra región cae entre el 5.6% y el 7.6%. Se ha asociado a la edad como el principal factor de riesgo, ya que conforme aumenta la expectativa de vida aumenta la cifra de personas con demencia [4, 3]. Se ha

reportado que en México existen alrededor de 800,000 personas con demencia, lo que representa aproximadamente 9% de la población mayor a 60 años [5, 6].

La EA es la causa más común de demencia senil, abarcando 60%-80% de los casos, se ha encontrado que la mitad de estos casos tienen características distintivas de la EA y el resto tiene características mixtas con patologías adicionales relacionadas a demencia. Hay estudios que muestran que personas con mayor edad con síntomas de demencia tienen anormalidades en el cerebro asociadas a más de una causa de demencia. La duración promedio de la EA es de 8-10 años, pero las fases sintomáticas clínicas son precedidas por los estadios preclínico y prodromico que usualmente se extienden por aproximadamente dos décadas [1, 4].

1.4 Clasificación

La enfermedad de Alzheimer puede ser clasificada con base en la edad de aparición en: presenil o temprana (EOAD, por sus siglas en inglés) (antes de los 65 años), y tardía o senil (LOAD) (después de los 65 años, la más común). La otra clasificación incluye a los factores genéticos que pudieran estar implicados en la aparición y progresión de la enfermedad, de esta forma, se puede clasificar en esporádica, relacionada con la forma senil; y familiar, relacionada con la forma temprana. Las formas esporádicas y familiares de EA son comparables, incluyendo las tasas de progresión y perfiles de biomarcadores[2].

1.4.1 Esporádica

Dentro de los diferentes tipos de EA, la esporádica, relacionada con la senil, es la más común, con una edad promedio de comienzo de 80 años. La principal

causa es la falla en la eliminación de A β del tejido cerebral. El historial familiar de casos con EA no es común en el tipo esporádico, sin embargo, se han relacionado algunos factores genéticos que aumentan el riesgo de padecer EA, como la presencia del alelo 4 de la apolipoproteína E (APOE4) [2, 7, 8].

1.4.1 Familiar

Una pequeña proporción de pacientes (<1%) presenta la enfermedad con un patrón de herencia dominante (DIAD, por sus siglas en inglés: Dominant Inherited Alzheimer's Disease), que se caracteriza por una edad de inicio temprana (~45 años), por lo que se relaciona con el tipo presenil o temprano. La DIAD se asocia a mutaciones patogénicas en los genes que codifican las siguientes proteínas: proteína precursora del amiloide (APP), ubicada en el cromosoma 21; presenilina 1 (PS1), codificada por *PSEN1* (cromosoma 14); y presenilina 2 (PS2), codificada por *PSEN2* (cromosoma 1) [9, 2].

1.5 Factores de riesgo

Con excepción de los casos de EA causada por anomalías genéticas, se cree que al igual que otras enfermedades crónicas, se desarrolla como resultado de múltiples factores más que por una sola causa. Así, se han determinado otros factores de riesgo relacionados a EA, entre los que se incluyen; diabetes mellitus, hipertensión, obesidad, inactividad física, depresión, tabaco y bajo nivel educativo. Sin embargo, la aplicación de cada factor de riesgo para disminuir la edad de comienzo o la severidad de la enfermedad aún no se determina. Estilos de vida que incluyan dieta adecuada, ejercicio y actividades de desarrollo cognitivo han mostrado beneficios al hacer más lenta la progresión de la enfermedad [3, 10].

1.5.1 Edad

La edad es el principal factor de riesgo, pues la mayoría de los casos de EA comienzan a partir de los 65 años. El porcentaje de personas con EA en Estados Unidos de América, incrementa de forma abrupta con la edad: 3% de la población de 65-74 años, 17% de la población de 75-84 años y 32% de la población de 85 años y más. Aunque se argumente que la EA es una consecuencia inevitable del envejecimiento, ya que muchas personas mayores a 90 años muestran evidencias de su presencia, la EA no es una parte normal del envejecimiento, y la edad por sí sola no es causa suficiente de esta enfermedad [11, 2].

1.5.2 Anomalías genéticas relacionadas con la Enfermedad de Alzheimer

Algunas mutaciones y la presencia de una copia extra del cromosoma 21 (síndrome de Down), afectan el riesgo de padecer EA. La DIAD tiene su origen en mutaciones raras de alta penetrancia en tres genes: *APP*, *PSEN1* y *PSEN2*. Las mutaciones en estos genes son garantía para desarrollar EA, ya que individuos con mutaciones en cualquiera de estos desarrollan EA antes de los 65 años, algunos en edad muy temprana (30 años) [12].

Sin embargo, estos genes se han identificado en la enfermedad de inicio temprano (EOAD); en la de inicio tardío, al ser más frecuente (99% de todos los casos), la presencia siquiera de una frecuencia baja de mutaciones representaría un gran número de familias afectadas. El factor de riesgo genético más asociado a LOAD es el genotipo de *APOE*. Estudios de ligación han identificado otros genes que muestran asociación significativa con riesgo de

padecer EOAD, algunos de estos genes son: *CLU*, *PICALM*, *BIN1*, *CR1*, *ABCA7*, *MS4A6A*, *CD33* y *CD2AP* [13].

1.5.2.1 Gen *APP*

El gen *APP* contiene 19 exones y mide aproximadamente 170Kb, el corte y empalme alternativo genera varias isoformas y se conoce que el péptido A β es codificado por los exones 16 y 17 [14]. Se ha reportado que mutaciones en este gen resultan en cambios de la secuencia aminoacídica del péptido A β y por lo tanto, en sus propiedades de agregación [15].

Se ha observado que individuos con síndrome de Down tienen mayor riesgo de padecer EA, ya que a los 40 años muchos de ellos tienen niveles significativos de placas del péptido A β y ovillos neurofibrilares (de la proteína Tau) esto puede ser debido a la presencia de una copia extra del cromosoma 21, que contiene el gen de la APP, que da origen al péptido A β , resultando en un aumento en la acumulación de éste en el cerebro [16].

1.5.2.2 Genes *PSEN1* y *PSEN2*

Presenilina 1 (PS1 - *PSEN1*, cromosoma 14); y presenilina 2 (PS2 - *PSEN2*, cromosoma 1) son proteínas que están presentes en las γ -secretasas que se encuentran directamente relacionadas con la formación del péptido β amiloide (A β) a partir de APP, por lo que cambios en la secuencia de dichos genes pueden conllevar a un aumento en la producción o cambios en la estructura de las proteínas, resultando en un posible aumento de la producción del péptido A β , por una mayor actividad de las γ -secretasas, dependiendo de la mutación [2, 9].

1.5.2.3 *APOE* en Enfermedad de Alzheimer

El gen *APOE* se encuentra localizado en el cromosoma 19 y la proteína codificada por él (ApoE), está involucrada en el catabolismo de lipoproteínas ricas en triacilglicéridos. Uno de los primeros reportes que relacionaron al gen

APOE con EA fue la inmuno-reactividad de ApoE en depósitos de A β y Tau. También se ha asociado la presencia de algunos polimorfismos en la región de regulación transcripcional del gen *APOE* a EA [17, 18, 19].

ApoE es una proteína de 299 aminoácidos con tres isoformas comunes que difieren en 1 o 2 aminoácidos: ApoE2 (Cys112 y Cys158), ApoE3 (Cys112 y Arg158) y ApoE4 (Arg112 y Arg158). Esta sustitución tiene efectos en la carga y estructura de la proteína, por lo que se altera la unión a receptores celulares y partículas lipoproteicas. ApoE tiene una alta expresión en el cerebro debido a que es producida inicialmente en astrocitos y microglía, bajo ciertas condiciones, las neuronas pueden producir ApoE. En el cerebro, ApoE deriva de la barrera hematoencefálica y está presente en el líquido cefalorraquídeo [7, 20].

Se ha demostrado que ApoE4 incrementa el riesgo de desarrollar EA, ya que se ha observado un aumento en la formación de placas dependiente del número de alelos de *APOE4* presentes. Adicionalmente, se ha observado que ApoE4 se une al péptido A β en líquido cefalorraquídeo, por lo que, con base en estos hallazgos, se cree que ApoE4 contribuye a la formación de placas del péptido A β al actuar como una proteína chaperona, afectando la eliminación de los agregados, aumentando la formación de los depósitos. Mientras que a la isoforma ApoE2 se le ha relacionado con un efecto protector. Se ha estimado que el alelo *APOE4* contribuye aproximadamente al 50% de los casos de EA esporádica [21, 19].

1.5.3 Otros factores de riesgo

Aunque la edad y la genética no pueden ser cambiadas, hay factores de riesgo que pueden modificarse para reducir el declive cognitivo y la demencia. Se tiene evidencia de que la actividad física e intelectual, diabetes, obesidad,

hipertensión y fumar son factores implicados en EA y que su aumento (sólo en el caso de la actividad física e intelectual) y cuidado pueden contribuir a reducir el riesgo de padecer demencia [22].

1.6 Fisiopatología

La EA se caracteriza por la presencia de algunos rasgos neuropatológicos como la pérdida de la sinapsis y muerte neuronal, además de un decremento en algunos neurotransmisores y la formación de algunos agregados proteicos: placas amiloides en el medio extracelular y de ovillos neurofibrilares dentro de las células, formados por la proteína Tau hiperfosforilada (Fig. 1) [23].

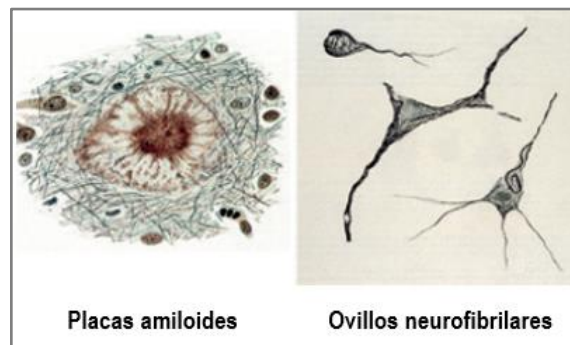


Figura 1. Características patológicas de la EA: Impregnación argéntica de los agregados característicos de la EA, dentro de las células se forman NTFs a partir de Tau hiperfosforilada, mientras que fuera de las células se forman las placas amiloides por la agregación del péptido A β (Tomada de Spielmeyer) [24].

1.6.1 Proteína tau y Ovillos Neurofibrilares

1.6.1.1 Ovillos Neurofibrilares

Los ovillos neurofibrilares (NFT, por sus siglas en inglés: Neurofibrillary Tangles), son agregados filamentosos de la proteína tau, que normalmente se

encuentra asociada a microtúbulos. Esta proteína se deposita al fosforilarse y sufrir cambios conformacionales en los que el monómero sin plegar cambia a una estructura polimérica (Fig. 1) [25].

1.6.1.2 Proteína tau

Una de las funciones principales de tau en las neuronas, es la estabilización de los microtúbulos en los axones. La proteína tau también participa en la transducción de señales, en la interacción de la actina con el citoesqueleto, crecimiento de neuritas, en la regulación del transporte de vesículas y en interacciones con la membrana como el anclaje de algunas enzimas [26].

La formación de agregados por parte de proteínas tau, es común en algunas enfermedades neurodegenerativas, conocidas como taupatías. La EA se caracteriza por un aumento en los niveles de tau y P-tau (fosforilada en los residuos 181 o 231) tanto en el cerebro como en el líquido cefalorraquídeo, aunque aún no se conoce si tau aumenta y se agrega por un incremento en la producción de dicha proteína o por un decremento en su eliminación [27]. Al formarse los agregados de P-tau, se desensamblan los microtúbulos, falla el transporte axonal, disminuye la sinapsis y las células mueren [28].

1.6.2 Placas amiloides, APP y péptido A β

1.6.2.1 Placas amiloides

Son lesiones con forma esferoide de 20-100 μ m de diámetro, están formadas principalmente por formas insolubles del péptido A β (originado a partir de la APP) (Fig. 1), aunque ya se han encontrado otras proteínas, como: el amiloide sérico P, proteoglicanos, ApoE4, citocinas y factores del complemento, entre otras [29].

Según la forma y distribución de las placas, éstas pueden clasificarse como difusas si están formadas por una red fina de filamentos del A β y no tienen bordes delimitados, en zonas con poca muerte celular. En cambio, las placas primitivas tienen una distribución más extensa, son más consistentes y se relacionan a neuritas distróficas y células gliales activas [29].

Las placas clásicas se relacionan con degeneración en el neurópilo con una región de placas rodeadas por células relacionadas a la respuesta inmune en el cerebro. En el estadio final se observa una desaparición del componente celular con zonas de placas condensadas [29].

1.6.2.2 Proteína Precursora del Amiloide (APP)

La proteína precursora del amiloide se expresa de forma ubicua y regularmente se procesa en fragmentos de menor tamaño según las enzimas que participen en este procesamiento. Las funciones de APP aún no se esclarecen en su totalidad, algunos estudios sugieren que participa en la migración celular y en la extensión neuronal, su delección resulta en un retraso en el desarrollo del organismo [30, 31].

1.6.2.1.1 Procesamiento de APP. La proteína precursora del amiloide normalmente es fragmentada por la α -secretasa, generando un fragmento fuera de las células (sAPP α) que se asocia a efectos neurotróficos (vía no amiloidogénica). Cuando esta proteína es cortada por la β -secretasa y el complejo γ -secretasa (vía amiloidogénica), se origina un fragmento pequeño correspondiente al péptido A β , asociado a la patogenia de EA y un péptido intracelular (AICD), asociado a señalización intracelular. AICD puede traslocarse al núcleo y regular la expresión de genes (por ejemplo, genes proapoptóticos). La proteína precursora del amiloide es cortada primero por la β -secretasa, generando un fragmento ectoplásmico (sAPP β) y un fragmento intermembrana (CTF β), que es cortado por el complejo γ -secretasa (Fig. 2)[32, 33, 34].

El complejo enzimático γ -secretasa se compone por cuatro subunidades: A Φ H1, PEN2, nicastrina y PS1 o 2, ésta última parece ser el sitio activo de la aspartilproteasa y la nicastrina podría tener su función en el acoplamiento del sustrato, que no sólo es APP. No se han identificado secuencias específicas en las subunidades de la γ -secretasa para el reconocimiento de los sustratos y el corte en la membrana es controlado por factores como el largo del dominio transmembrana, esta falta de especificidad en el sitio de corte genera péptidos de distinta longitud [35, 36, 37].

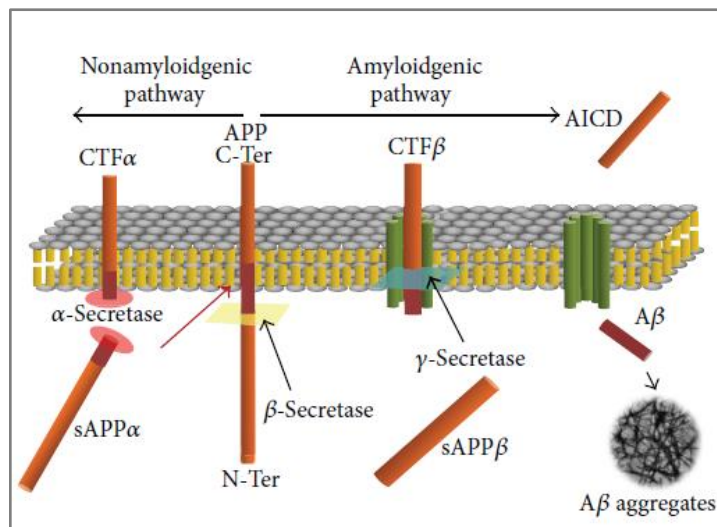


Figura 2. Procesamiento de APP: según los complejos que corten a APP se generan diferentes productos, divididos en dos vías. En la vía no amiloidogénica, APP es procesada por α -secretasa, produciendo sAPP α y CTF α . En la vía amiloidogénica, APP es procesada por β - y γ -secretasas, produciendo AICD, sAPP β y A β , lo que conlleva a la formación de agregados A β y su posterior depósito en forma de placas amiloides. (Tomada de Picone y cols) [38].

1.6.2.2 Péptido A β

El péptido A β puede tener una longitud variable, de 37-49 aminoácidos, los más comunes son el A β (40) y A β (42); las formas más largas son más hidrofóbicas y fibrillogénicas. Es el principal componente de las placas presentes en la neocorteza en cerebros de pacientes con EA [39].

El péptido A β está intrínsecamente desordenado y por esta razón no puede ser cristalizado por métodos tradicionales. La mayor parte del conocimiento generado de este péptido proviene de estructuras obtenidas a partir de resonancia magnética nuclear (NMR). Estas estructuras proponen que el péptido A β se encuentra inicialmente en forma de α -hélice y sufre un cambio conformacional a lámina β plegada durante etapas tempranas de la vía amiloidogénica ya que contiene dos fragmentos hidrofóbicos [40].

1.6.2.2.1 Agregación del péptido A β . El cambio conformacional promueve la agregación del péptido A β hasta formar fibrillas que se depositan en las placas amiloides (Fig. 3). Estas fibrillas se forman por el contacto específico de ciertos aminoácidos, teniendo repercusiones en su estabilidad, morfología y organización [41]. Así pues, las vías de agregación del péptido A β están determinadas por la secuencia aminoacídica y las interacciones intermoleculares.

Entre los distintos intermediarios en la agregación del péptido A β , se encuentran los agregados solubles, que, a diferencia de las fibrillas, pueden entrar a las células. El tamaño de estos oligómeros es variable, de 100-200kDa [42, 40, 43]. Los monómeros pueden formar agregados de bajo peso molecular, incluyendo: dímeros, trímeros, tetrámeros o pentámeros, a agregados de peso molecular medio: hexámeros-dodecámeros, a protofibrillas y fibrillas maduras [40].

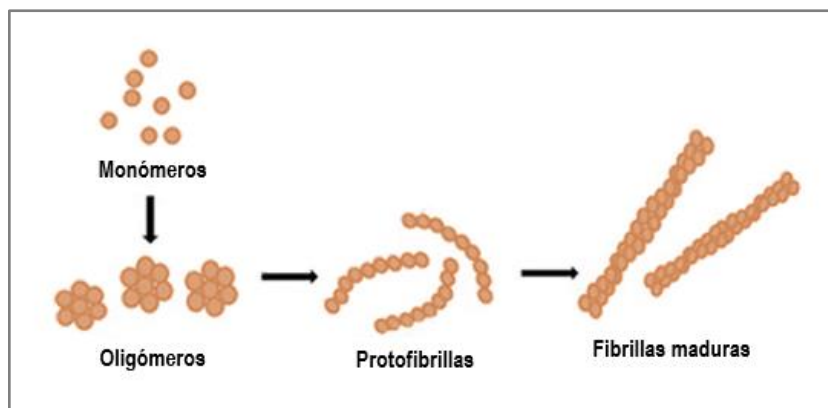


Figura 3. Agregación de A β : Después del cambio conformacional, se comienzan a formar oligómeros de bajo a medio peso molecular (dímeros a dodecámeros), protofibrillas y fibrillas (Adaptado de Chen G-f y cols, 2017) [40].

1.6.2.2.2 Péptido A β (25-35). Se compone por 11 aminoácidos que se encuentran en los péptidos A β 40 y A β 42 y es un derivado muy tóxico, debido a que conserva un fragmento hidrofóbico que se encuentra en forma de α -hélice cuando se encuentra en un ambiente lipídico susceptible de sufrir un cambio conformacional y formar agregados fibrilares (Fig. 4), que sugieren un mecanismo directo de neurotoxicidad [44, 45]. Es producido en el cerebro de pacientes con edad avanzada por el corte proteolítico de los péptidos más largos y representa la región biológicamente activa de estas formas. Debido a lo anterior es utilizado para el establecimiento de modelos celulares [46, 47].

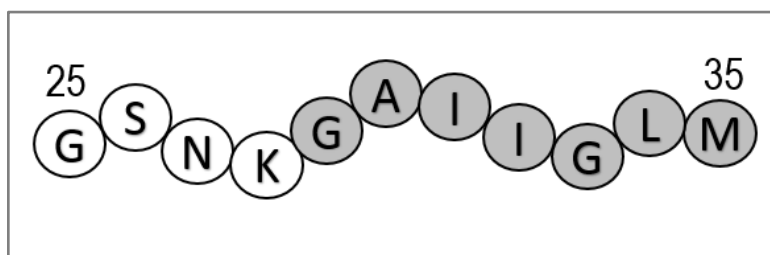


Figura 4. Péptido A β (25-35): Está compuesto por 11 aminoácidos que comprenden el fragmento 25-35 de los péptidos de 40 y 42 aminoácidos, conserva su toxicidad porque contiene un fragmento hidrofóbico (29-35), implicado en el cambio conformacional, esencial para su agregación.

1.7 Hipótesis de la Cascada del Amiloide

Los descubrimientos que relacionan al péptido A β condujeron a la elaboración de la hipótesis de la cascada del amiloide. Esta hipótesis estipula que un aumento en el procesamiento de la APP por la β -secretasa y el complejo enzimático γ -secretasa conlleva a un aumento de la formación de agregados (Fig. 2). Estos agregados del A β conducen a eventos como: la pérdida de sinapsis celular, depósito de placas, inflamación y fosforilación de Tau, derivando en la aparición y progresión de la demencia [48].

1.8 Alteraciones neuronales causadas por el péptido A β

La acumulación de A β conduce a la formación de oligómeros y gradualmente a su depósito como fibrillas maduras y placas seniles. Tau comienza a hiperfosforilarse en respuesta a los cambios en la actividad de las cinasas y fosfatasas mediados por la agregación de A β , conduciendo a la formación de NFTs, disfunción neuronal y sináptica. Cuando A β se acumula en la membrana, se genera un aldehído tóxico conocido como 4-hidroxinonenal y se da la peroxidación de lípidos, dañando la función de ATPasas, y transportadores de glucosa y glutamato. A β promueve la despolarización de la membrana sináptica, ocurre un flujo de calcio en exceso y daño en la mitocondria [49]. Así, el A β se relaciona con alteraciones en las células como: disfunción mitocondrial, inhibición del proteosoma, efectos en la vía de la autofagia y estrés oxidativo [50, 51, 38].

1.8.1 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se debe a un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y un decremento en la respuesta celular antioxidante. La principal fuente de radicales libres es la mitocondria, por la fosforilación oxidativa, causando la formación del radical superóxido (O_2^-) [50]. El alto contenido de lípidos en el tejido nervioso, en conjunto con su elevado metabolismo aeróbico, lo hace vulnerable al daño oxidativo que daña a las moléculas biológicas [52].

Las proteínas pueden ser oxidadas directamente por ROS o por productos de otras reacciones de oxidación, como el malondialdehído y el 4-hidroxinonal, que son productos de la peroxidación de lípidos. Esta oxidación de proteínas conduce a la modificación en sus estructuras secundaria y terciaria, al ocasionar la disociación de subunidades, mal plegamiento, exposición de residuos hidrofóbicos, agregación y fragmentación [53]. La formación de proteínas carbonilo (por la aparición de grupos carbonilo, como aldehído) indica la oxidación de las proteínas, lo que resulta en la pérdida de la función de las proteínas afectadas [54, 55]. La reacción del radical superóxido (O_2^-) con el radical libre óxido nítrico (NO) produce peroxinitrito y CO_2 por la modificación de los residuos de tirosina para producir 3-nitrotirosina [56]. La nitración y carbonilación de proteínas inactiva su función por la alteración de su estructura, teniendo un efecto en la regulación de vías con consecuencias patológicas [57].

El daño oxidativo es de particular interés en enfermedades neurodegenerativas como EA, ya que en la mayoría de los casos es un fenómeno no reversible y altera las funciones neuronales [50]. La susceptibilidad a ROS depende de: variaciones en el pH, la localización de las proteínas (por ejemplo: en la membrana), la estructura tridimensional y la secuencia aminoacídica, por ejemplo: cisteína y metionina son muy susceptibles a oxidarse por la presencia de azufre [58].

La oxidación de proteínas afecta distintos procesos, incluyendo la expresión y regulación de genes, señalización, apoptosis y necrosis, conduciendo a la pérdida de homeostasis celular. La formación de agregados proteicos tóxicos es una de las consecuencias de la oxidación de proteínas [50]. Por ejemplo, el estrés oxidativo puede activar vías de señalización que alteran el procesamiento de APP y Tau, al incrementar la expresión de β -secretasa a través de la activación de cinasas C-jun N-terminal (JNKs) y proteínas cinasas p38 activadas por mitógeno (MAPK) [59]. Incrementa la hiperfosforilación de tau por la activación de la cinasa de la glicógeno sintasa 3- β (GSK3- β) [60]. Aún no se establece si el estrés oxidativo es una causa o consecuencia de la agregación del péptido A β y de las demás alteraciones neuronales.

1.8.1.1 Oxidación de la Metionina

La metionina (Met) es fácilmente oxidable por la presencia del azufre, generando sulfóxido de metionina (MetSO). Con base en algunos estudios, se propone que la metionina puede servir como un componente de un sistema de regulación del metabolismo celular mediante el cual la oxidación de residuos de metionina expuestos sirve para proteger a otros residuos esenciales del daño oxidativo [61]. Las enzimas metionina sulfóxido reductasas (Msrs) tienen la capacidad de reducir el sulfóxido de metionina a metionina, utilizando la conversión de Met a MetSO y viceversa para regular la actividad biológica de proteínas a través de las alteraciones en la eficiencia catalítica y la modulación de la hidrofobicidad de la superficie proteica. En algunos trastornos neurodegenerativos se observa una disminución en los niveles de Msrs, lo que podría estar relacionado a la presencia de ROS a partir de Met [62].

1.8.2 Disfunción mitocondrial

Las neuronas son células con una morfología particular, extendiendo los axones y las dendritas desde milímetros a metros. Las mitocondrias están dispersas por las células con una mayor presencia en áreas como la sinapsis, con una demanda alta de ATP y juegan un papel importante en la reducción de la concentración de Ca^{2+} en la base de los axones [38]. En estos organelos se ha observado la presencia y acumulación del péptido A β [63].

Muchos aspectos de la relación entre la disfunción mitocondrial y EA aún no se elucidan, pero hay evidencia de que la acumulación progresiva de A β en la mitocondria podría tener relación con la toxicidad mediada por ésta. Así, la mitocondria y el metabolismo energético juegan un papel importante en la supervivencia celular y la muerte celular al regular vías apoptóticas y contribuir a diferentes funciones celulares, como: la homeostasis de calcio intracelular, mantenimiento del potencial redox, regulación del ciclo celular y plasticidad sináptica [64, 38].

Existe evidencia que supone que los péptidos A β son acarreados a la mitocondria e internalizados por el complejo TOM (traslocasa de membrana externa), que se encuentra en la membrana externa de la mitocondria y cuya función normal es permitir el movimiento de proteínas a través de esta barrera hacia el espacio intermembrana. A β altera la actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria I, III y IV. Además de afectar la dinámica mitocondrial por el desbalance causado en los procesos de fisión-fusión, al aumentar la fisión (DRP1); también causa la formación del poro de transición de permeabilidad de la membrana (mPTP) por la interacción del A β con la ciclofilina D (CypD), induce el decremento en la respiración mitocondrial, afecta la biogénesis mitocondrial e incrementa la generación de ROS [38].

1.8.2.1 ROS y disfunción mitocondrial

El incremento de ROS es una consecuencia inmediata de la disfunción mitocondrial, promoviendo el daño oxidativo a ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. Cuando las mitocondrias están dañadas, las defensas antioxidantes se reducen, lo que genera más ROS y la pérdida de la capacidad antioxidante. Las ROS pueden originarse a partir de reacciones en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y/o en la cadena respiratoria [65, 66].

1.8.2.2 A β y Bioenergética

Se ha observado disfunción en los complejos I, III y VI de la cadena respiratoria con la presencia de A β en la mitocondria, derivando en la disminución en la producción de ATP por fosforilación oxidativa, y en la actividad de la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH) y enzimas reguladoras de citocromo C oxidasa (COX), además del incremento en el estrés oxidativo. También se ha observado la reducción en la expresión de enzimas metabólicas como: citrato sintasa y succinato deshidrogenasa, con lo que disminuyen los niveles de NAD⁺/NADH, la actividad de la subunidad IV de COX y el potencial de membrana mitocondrial [67].

1.8.2.3 A β y Dinámica mitocondrial

Estudios recientes muestran que la proteína de fisión relacionada a dinamina 1 (Drp1) interactúa con A β y fosforila a tau, conduciendo a una excesiva fragmentación mitocondrial, deficiencias en el transporte axonal de la mitocondria y, finalmente, el daño neuronal y el declive cognitivo. También se han descrito reducciones en la expresión de las proteínas de fusión OPA1, Mfn1 y Mfn2 y un aumento en la expresión de la proteína de fisión Fis1 [68, 69].

1.8.2.4 Formación del mPTP

Se ha demostrado que la peptidilpropil isomerasa F, CypD, se une a A β , formando un complejo que provoca que CypD se trasloque de la matriz mitocondrial a la membrana interna, donde tiene un papel fundamental en la

formación del mPTP, lo que resulta en una disminución en el potencial de membrana, comprometiendo así la función de respiración mitocondrial, ocasionando un incremento en el estrés oxidativo, la liberación del citocromo C y el deterioro del transporte axonal mitocondrial [38, 70].

1.8.3 Efectos en la vía de la autofagia

La autofagia es un mecanismo conservado en organismos eucariotas con tres formas distintas, dependiendo de la forma de entrega del autofagosoma a los lisosomas: macroautofagia, autofagia mediada por chaperonas y microautofagia. De estos, la más común es la macroautofagia, que involucra la formación, tráfico, maduración y degradación de las estructuras de doble membrana conocidas como autofagosomas. En conjunto este proceso es conocido como flujo o vía de autofagia y la disrupción de cualquiera de sus etapas resulta en fallas en la degradación de los autofagosomas [71].

El complejo mTORC1 (mTOR más RAPTOR), regula negativamente la vía de autofagia al inhibir a ULK1 (Cinasa de tipo Unc51 1), que se encarga de generar un complejo con Atg13 (proteína relacionada a autofagia 13), y FIP200 (por sus siglas en inglés: FAK Family Interacting Protein of 200 kDa), este complejo es esencial para reclutar proteínas que se encargan de formar el sitio de formación del fagóforo (PAS) o la estructura preautofagosómica. La actividad de mTOR puede regularse negativamente en condiciones de inanición y con fármacos como la rapamicina o análogos (Fig. 5) [72].

La vía de autofagia es esencial en neuronas, al facilitar la remoción de agregados de proteínas ubiquitinizadas, evitando así la neurodegeneración [73]. En EA la autofagia se ve afectada, sin embargo, se cuenta con reportes contrastantes, ya que se ha observado que en algunos pacientes y modelos *in*

vivo hay una elevada actividad de mTOR, potenciando la acumulación de A β por la inhibición de la vía de autofagia [74, 75, 76].

Por otro lado, en otros casos se observa un aumento en la actividad de la vía de autofagia en respuesta a los niveles elevados de agregados del A β o NFTs en el citosol [77, 78, 79]. Aunque aún no se sabe por qué sucede este incremento de autofagosomas, se cree que podría deberse a defectos en su degradación por la oxidación de proteínas como la ATPasa vacuolar (V₀-ATPasa) o la Catepsina D (CTSD), implicadas en la acidificación y degradación proteica de los autolisosomas (producto de la fusión de autofagosomas con lisosomas)[71, 50].

Existen reportes que indican que el péptido A β (25-35) puede inducir una actividad elevada de la vía de autofagia *in vivo* e *in vitro*, produciendo una acumulación de autofagosomas y disminuyendo la viabilidad celular a las 24 horas de tratamiento [79, 80, 46].

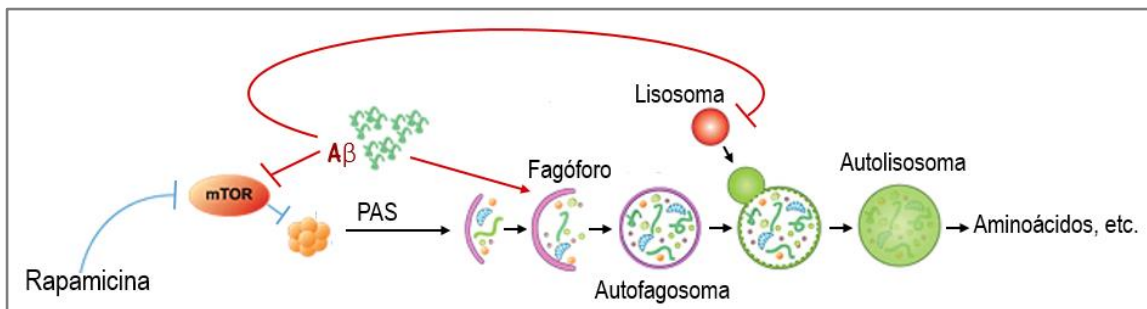


Figura 5. Efecto del péptido A β (25-35) sobre el flujo de autofagia: El péptido A β (25-35) induce a una acumulación de autofagosomas que llevan a la muerte celular. Sin embargo, aún no se esclarece si este efecto es debido a un aumento en la formación de autofagosomas y/o por la inhibición de la degradación de los autofagosomas (modificado de Enzo LifeSciences).

1.9 Inhibición de la agregación del péptido A β

Los tratamientos disponibles funcionan inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa, bloqueando la hidrólisis de la acetilcolina; o reduciendo la actividad del glutamato, que tiene un papel importante en el aprendizaje y memoria, con bloqueadores de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDAR). Sin embargo, sólo disminuyen los síntomas de EA, por tal motivo se han buscado otras alternativas que se enfocan en la reducción de los niveles del péptido A β . Algunos de los métodos más estudiados incluyen: inhibición de la formación de oligómeros con moléculas pequeñas, la neutralización de oligómeros con inmunoterapia, la sobreexpresión de enzimas degradadoras de los agregados, entre otras [40]. También se ha trabajado en la generación de tratamientos enfocados en los agregados de Tau, sin embargo, es una proteína esencial para la vida, mientras que el péptido A β es un producto patogénico, por lo que se considera conveniente trabajar en terapias enfocadas en su reducción.

1.9.1 Péptidos basados en la estructura del A β

Se han diseñado péptidos basados en la secuencia del A β para inhibir su agregación, estos péptidos se basan especialmente en los centros hidrofóbicos A β (29-35) y A β (16-20) (KLVFF) debido a que estos segmentos son clave para que el péptido sufra cambios conformacionales y son responsables de la agregación. Los cambios más comunes a los que se someten los péptidos A β de diferentes longitudes son: modificación de residuos aminoacídicos, la adición de moléculas y cambios en la secuencia de aminoácidos [81].

Por ejemplo, en el centro hidrofóbico 16-20 se han realizado sustituciones en Lys16, Leu17 y Phe20 por Ala [82]; y sustituciones de las Phe19 y 20 por sus D-

enantiómeros [83]. Mientras que en el centro hidrofóbico 29-35 se ha realizado la sustitución de Lys28 por Ala [84] y Met35 por Cys [85], observando diferencias en la agregación al comparar con el péptido sin modificar.

1.10 Antecedentes

Este trabajo se centra en el uso del péptido A β (25-35) y de tres variantes del mismo: Ala30Trp (A30W), Lys28Ala (K28A) y Met35Cys (M35C), que fueron seleccionadas al observar cambios en la estructura de los agregados por medio de modelaje molecular (Fig. 6), y por algunos antecedentes previos con péptidos más largos.

La mutante K28A ya ha sido reportada anteriormente en fragmentos más largos por Sinha y colaboradores [84], lo que se pretendía con su estudio era disminuir la formación de agregados con base en el papel que tienen los residuos de Lys en la agregación, pues se ha reportado que al ser un aminoácido básico, puede formar un puente salino con Asp23 [86]. De esta forma, al cambiar la carga se evitan interacciones dependientes de ésta, implicadas en la formación de agregados.

Dai y colaboradores reportaron el uso de la variante M35C del péptido A β (40) [85], con el objetivo de disminuir la generación de ROS a partir de la metionina, observando un menor efecto sobre la viabilidad en comparación con el péptido silvestre.

La variante A30W no ha sido reportada, sin embargo, ésta fue elegida por el impedimento estérico que genera el residuo del triptófano en una zona bisagra de la lámina β plegada, al ser de mayor tamaño que el de la alanina, teniendo repercusiones en la formación de agregados (Fig. 6).

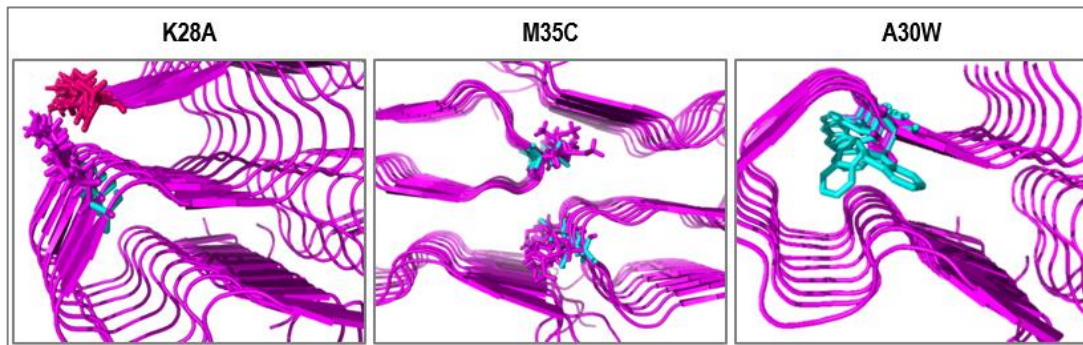


Figura 6. Variantes del péptido A β (25-35): Las imágenes de la estructura de agregados fibrilares formados por las distintas variantes (diseñadas *in silico*) muestran los cambios en los residuos ocasionados por la sustitución de aminoácidos.

1.10.1 Antecedente directo

En el trabajo de Maestría realizado por la M. C. Ana Esther Estrada Rodríguez, no se observaron diferencias significativas en el efecto sobre la viabilidad en células C6 de glioblastoma de rata al ser tratadas con el péptido A β (25-35) silvestre (WT) y variantes. Sin embargo, se observó una diferencia significativa en la producción de ROS en las células C6 al ser tratadas con la variante K28A en comparación con el A β (25-35) WT (Fig. 7) [87]. Por lo que, al observar que una de las alteraciones ocasionadas por el A β (25-35) es diferente con la variante K28A y los efectos sobre la viabilidad celular son similares en todos los péptidos, es relevante conocer si los mecanismos que conllevan a la muerte celular son diferentes o similares al tratar las células con el péptido A β (25-35) y sus variantes.

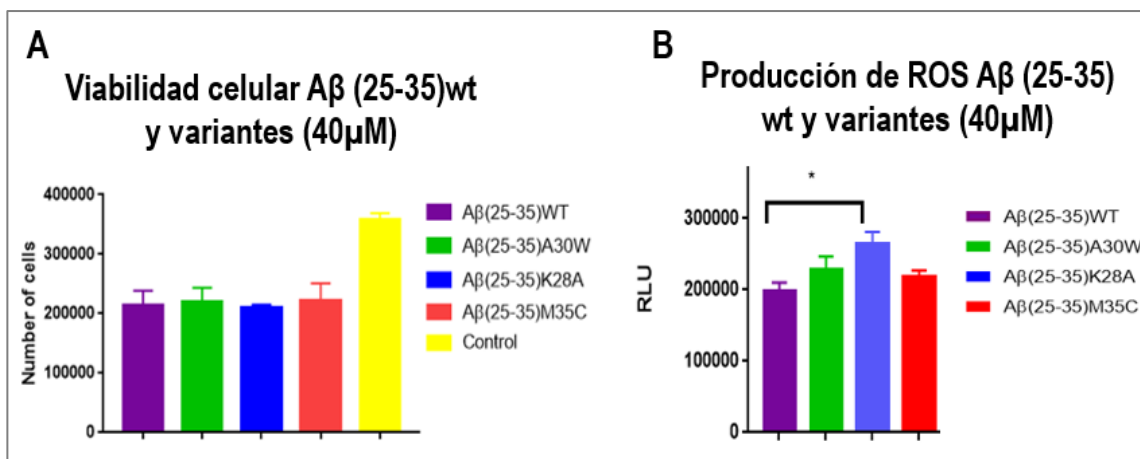


Figura 7. Gráficas del efecto sobre la viabilidad celular y producción de ROS con Aβ(25-35) y variantes: **A)** Efecto sobre la viabilidad celular, no se observan diferencias significativas en el efecto sobre la viabilidad en células C6 al ser tratadas con el péptido Aβ(25-35) silvestre (WT) y variantes. **B)** Producción de ROS con Aβ(25-35) y variantes, se observa una diferencia significativa en la producción de ROS en las células C6 al ser tratadas con la variante K28A en comparación con el Aβ(25-35) WT [87].

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

2.1 Justificación

La EA es la demencia senil más común, cuyo costo es elevado y actualmente los tratamientos disponibles no son eficientes. El péptido A β está relacionado con la EA, sin embargo, aún no se esclarecen los mecanismos por los que las formas del péptido A β afectan a las células. El estudio y comprensión de los mecanismos de toxicidad del péptido A β (25-35) es vital para generar estrategias farmacológicas con la finalidad de evitar y/o retrasar el progreso de la enfermedad. Existen muy pocos estudios sobre mecanismos moleculares, por lo que en este trabajo se pretenden evaluar los mecanismos relacionados con citotoxicidad del A β (25-35) y sus variantes.

2.2 Hipótesis

Los mecanismos moleculares que se alteran con el péptido A β (25-35) pueden modificarse mediante mutaciones puntuales.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Caracterizar estructuralmente y evaluar el efecto del péptido A β (25-35) y sus mutantes: A30W, K28A y M35C, sobre la viabilidad, apoptosis y vía de la autofagia en un modelo de cultivo celular.

3.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar estructuralmente los oligómeros del péptido A β (25-35) y sus mutantes mediante microscopía de fuerza atómica.
2. Determinar si el péptido A β (25-35) y sus variantes son capaces de internalizarse en células C6 de glioblastoma de rata y analizar su estado de agregación.
3. Evaluar el efecto del péptido A β (25-35) y sus variantes sobre la viabilidad y apoptosis en la línea celular C6 de glioblastoma de rata.
4. Evaluar el efecto del péptido A β (25-35) y sus variantes sobre la vía de autofagia.

CAPÍTULO 4

MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

4.1 Reactivos

4.1.1 Solubilización y Agregación de péptidos

- A β (25-35) WT (GenScript)
- A β (25-35) A30W (GenScript)
- A β (25-35) K28A (GenScript)
- A β (25-35) M35C (GenScript)
- PBS 1X
- NaOH 2 M (Sigma-Aldrich)

Tabla I. Secuencia de aminoácidos del péptido A β (25-35) WT y las variantes: A30W, K28A y M35C.

Péptido	Secuencia de aminoácidos
WT	GSNKGAIIGLM
A30W	GSNKGWIIGLM
K28A	GSNAGAIIGLM
M35C	GSNKGAIIGLC

4.1.2 Cultivo celular

Todos los reactivos son de la marca Invitrogen-Gibco

- Dulbecco's Modified Eagle Medium Advanced (Advanced DMEM)
- L-Glutamina (200 mM 100X)
- Suero Fetal Bovino (SFB) (2.5%)
- Solución antibiótico penicilina-estreptomicina (100 UI/mL de penicilina G de sodio y 100 µL/mL de sulfato de estreptomicina)
- Azul de tripano (0.4%)
- Tripsina (Gibco)

4.1.3. Extracción de proteínas y Western Blot

- RIPA (Buffer de Ensayo de Precipitación Radio-Inmune)
- Anti-A β oligomérico Ab126892 (Abcam)
- Anti-LC3 (Abcam)
- Anti-GAPDH (Santa Cruz)
- Anti-IgG-HRP (Santa Cruz)
- Tween 0.5% (BioRad)
- Poliacrilamida (BioRad)
- Quick Start Bradford 1X Dye Reagent (BioRad)
- Silver Stain Plus Kit (BioRad)
- Pierce TM ECL Western Blotting Substrate
- Membrana de PVDF (BioRad)
- Leche sin grasa (Nestle)

4.1.4. Efectos sobre la viabilidad y apoptosis

- CellTiter-Glo (Promega)
- ApoTox-Glo Triplex Assay (Promega)
- Rotenona R8875(Sigma)

4.1.5. Efectos sobre la vía de la autofagia

- Rapamicina ab139484 (Abcam)
- Cloroquina ab139484 (Abcam)

4.2 Materiales

4.2.1 Materiales de uso general

- Micropipetas automáticas de volumen variable: 0.2-2 μ L, 2-20 μ L, 20-200 μ L y 100-1000 μ L (Thermo Scientific).
- Puntillas para micropipetas de volumen variable
- Tubos Eppendorf de 0.2, 0.6 y 2 mL.
- Tubos cónicos de 15 y 50 mL (Corning).

4.2.2 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

- Cubreobjetos de vidrio con superficie lisa de 10mm de diámetro (Ted Pella Inc.).

4.2.3 Material biológico

- Línea celular C6 de glioblastoma de rata

4.2.4 Cultivo celular

- Pipetas serológicas estériles de: 2 mL, 10 mL y 25 mL (Corning)
- Placas Petri de 100x15 mm (Corning)
- Placas de 24 pozos (Corning)
- Placas de 96 pozos con fondo transparente y paredes blancas (Corning)
- Placas de 96 pozos con fondo transparente y paredes negras (Corning)
- Crioviales 1.5 mL (Corning)
- Cámara de Neubauer
- Pipetas pasteur (Corning)

4.3 Equipos

4.3.1 Equipos de uso general

- Vórtex Genie
- GloMax- Multi Detection System (Promega)

4.3.2 Microscopía de Fuerza Atómica

- Microscopio MultiMode V8 SPM NanoScope (Bruker)
- Escáner piezo-eléctrico (J-scanner)

4.3.3 Solubilización y agregación de péptidos

- Sonicator Ultrasonic Processor
- Agitador ThermoMixer C (Eppendorf)

4.3.4 Cultivo celular

- Campana de Flujo laminar clase II (ESCO)
- Incubadora de CO₂ con cámara de acero inoxidable Forma Steri-cycle i160 (Thermo Scientific)
- Bomba de vacío Rocker 600 (Rocker scientific)
- Baño de agua Precision 180 (Thermo)
- Microscopio óptico invertido Olympus CKX41

4.3.5 Internalización celular y estado de agregación

- Microcentrífuga refrigerada PRISMR (Labnet).
- Cámara de electroforesis vertical (BioRad).
- Semi dry blot system (BioRad).
- Fotodocumentador ChemiDoc XRS+ (BioRad).

CAPÍTULO 5

MÉTODOS

5.1 Estrategia general

Primero, se realizó la caracterización estructural de los agregados del péptido A β (25-35) y sus variantes por medio de microscopía de fuerza atómica, luego se determinó si los distintos péptidos pueden internalizarse en las células C6 de glioblastoma de rata y se evaluó mediante western blot si se encontraban en estado oligomérico. Después, se evaluaron los efectos sobre la viabilidad y apoptosis por luminiscencia. Los efectos sobre la vía de autofagia se evaluaron por western blot. En todos los ensayos se utilizó un tratamiento por péptido, con un control sin tratamiento y un control positivo, que dependió del mecanismo a evaluar, todos con un número mínimo de tres repeticiones por tratamiento. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 7, considerando una $p < 0.05$ para obtener significancia estadística (Fig. 8). Finalmente, los resultados se integraron con la finalidad de dilucidar los mecanismos que se afectaron con cada variante del péptido A β (25-35) y si estos efectos fueron distintos de los mecanismos afectados por el péptido silvestre (WT).

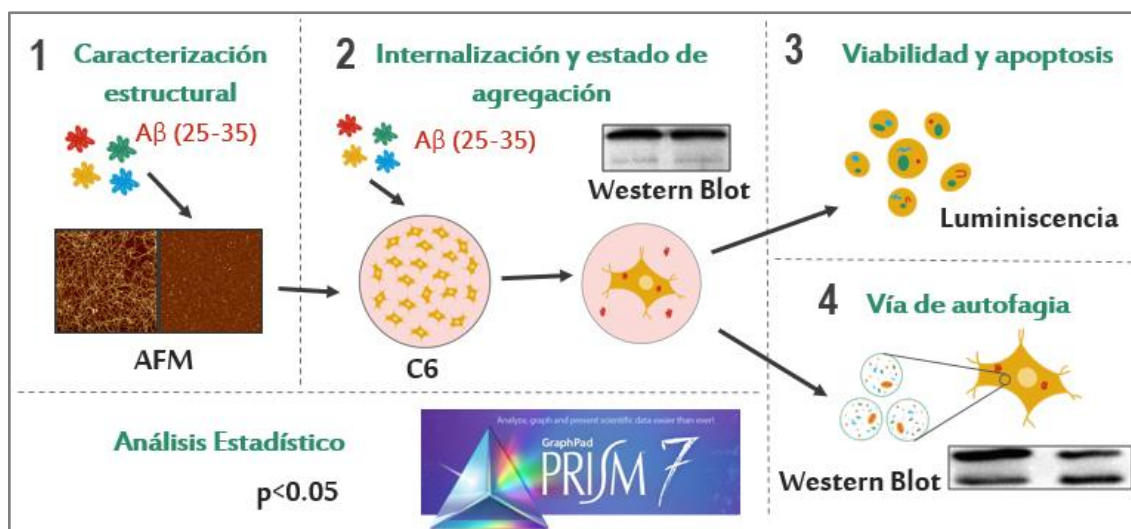


Figura 8. Estrategia general: Se comenzó con la caracterización morfológica de los agregados de las distintas variantes del péptido Aβ(25-35). La internalización y el estado de agregación se evaluaron por western blot. Finalmente, se evaluaron los efectos sobre la viabilidad y apoptosis, así como sobre la vía de la autofagia.

5.2 Solubilización y agregación de péptidos

Para obtener una concentración de péptido de 1 ng/μL (stock) se solubilizaron los distintos péptidos por separado. Se pesó 1mg de cada uno y se disolvió en 200 μL de NaOH 0.2 M y 800 μL de PBS 1X, con un volumen final de 1 mL. Después se sonicaron por 15 min en frío (Fig. 9).

Para obtener los agregados de los distintos péptidos se colocó la cantidad a utilizar de cada péptido del stock descrito anteriormente en tubos de 2 mL (un tubo por péptido), esta cantidad dependía del tipo de ensayo que se iba a realizar en cultivo celular, pero tenía la finalidad de tener una concentración final de 40 μM por péptido en los tratamientos. Estos tubos se incubaron a 37°C en agitación (340 rpm) por 96h (Fig. 9).

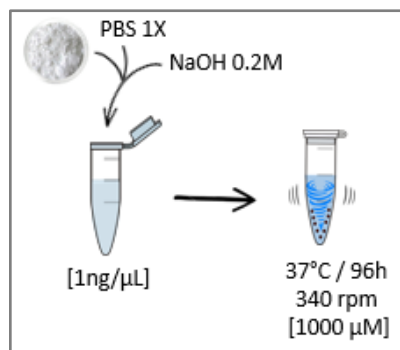


Figura 9. Esquema de la solubilización y agregación de péptidos: Los péptidos liofilizados fueron resuspendidos en PBS y NaOH. La agregación se realizó a 37°C en agitación (340 rpm) por 96 h.

5.2 Microscopía de Fuerza Atómica

Se agregaron los distintos péptidos resuspendidos a 1 ng/ μ L en agitación a 37°C por 0 y 12 h, estas muestras se depositaron en un cubreobjetos de vidrio con superficie lisa de 10 mm de diámetro (Ted Pella Inc.) para realizar la caracterización estructural de agregados. Se utilizó el microscopio MultiMode V8 SPM NanoScope (Bruker) con un escáner piezo-eléctrico (J-scanner) con un área de escaneo máximo de 160 x 160 μ m².

Se usó un cantiléver con una punta de Si₃N₄ con una longitud de 125 μ m, con una frecuencia de resonancia de 300 kHz y una constante de resorte de 40 N/m en modo de amplitud modulada o contacto intermitente, modo en el que se mide la topografía de la muestra (altura) monitoreando la amplitud de oscilación del cantiléver mientras que se escanea la sonda en la superficie de la muestra.

Las velocidades de exploración fueron 0.5-1 Hz y se colectaron en modo altura, con fuerza constante, se utilizó el software NanoScope (Bruker) para obtener las medidas de altura de las imágenes de los agregados amiloides y el análisis de rugosidad (Ra) se calculó como la media aritmética de los valores absolutos

de las desviaciones de altura superficial obtenidas a partir del plano medio sobre los 100 cuadrados de $1 \mu\text{m}^2$ que conforman las imágenes $100 \mu\text{m}^2$ obtenidas de cada muestra (Fig. 10).

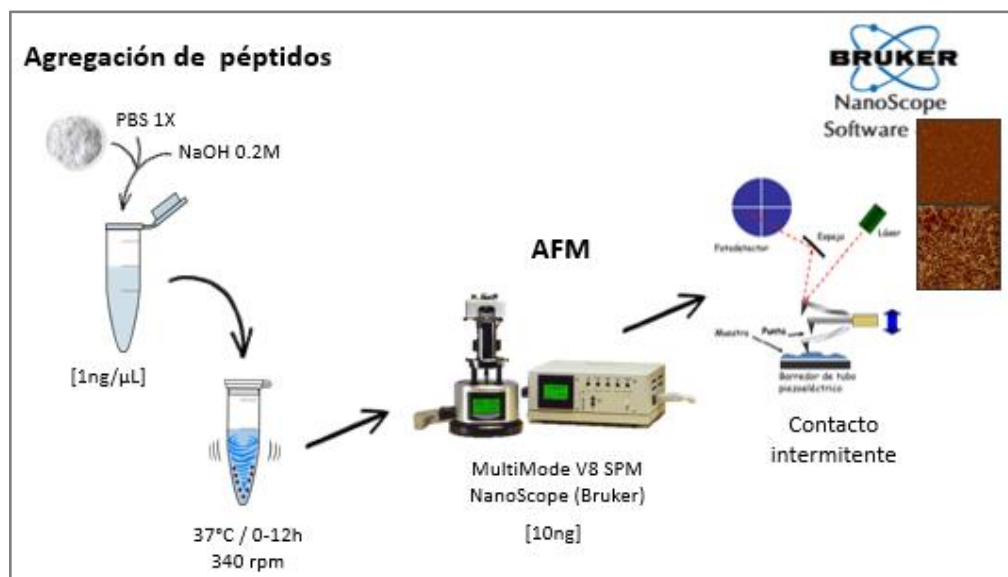


Figura 10. Esquema de la caracterización por AFM: Primero se realizó la agregación de los péptidos a distintos tiempos y después se observó al microscopio de fuerza atómica con la modalidad de contacto intermitente.

5.3 Internalización celular y estado de agregación

Para determinar si los agregados de las distintas variantes del péptido $A\beta(25-35)$ eran internalizados en las células y evaluar si estos agregados se encontraban en estado oligomérico se cultivaron 200,000 células por pozo en placas de 24 pozos con 1 mL de medio y se incubaron por 24 h a 37°C con 5% de CO_2 , después, el medio fue reemplazado por 500 μL de medio nuevo y los péptidos previamente agregados fueron añadidos a una concentración de 40 μM , nuevamente se incubó por 24 h a 37°C con 5% de CO_2 . Los tratamientos fueron los siguientes: agregados de $A\beta(25-35)$ WT, A30W, K28A y M35C (un

tratamiento por péptido), A β (25-35) WT soluble (sin agregar) y un grupo de pozos sin tratamiento. Por cada tratamiento se contó con cuatro pozos, después del tiempo de incubación se realizó la extracción de proteínas (Fig. 11).

5.3.1 Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas intracelulares se retiró el medio de los pozos después de tratar con los distintos péptidos y se reservó en tubos eppendorf de 2 mL. Luego, se añadieron 300 μ L de tripsina, la placa se incubó en las condiciones estándar mencionadas con anterioridad por 5 min, después se añadieron 700 μ L de medio a cada pozo y se transfirió el contenido de cada pozo a un tubo eppendorf de 2 mL, los pozos fueron lavados tres veces con 300 μ L de la mezcla tripsina-medio. Los tubos que contenían las células tripsinizadas se centrifugaron por 5 min a 500 rcf a temperatura ambiente, después, el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y el botón formado fue resuspendido en 1 mL de PBS a 4°C, se realizó otra centrifugación en las mismas condiciones y el sobrenadante de cada tubo fue transferido a tubos nuevos. Finalmente, el botón formado fue resuspendido en 20 μ L de RIPA y los tubos fueron agitados 5 s en vórtex e incubados 20 min en frío, se realizó una última centrifugación por 5 min a rcf máximas a 4°C y el sobrenadante de cada tubo fue transferido a tubos nuevos (extracto proteico), el precipitado fue reservado junto con todos los tubos a los que se les transfirió el medio o los sobrenadantes obtenidos en pasos anteriores (Fig. 11).

El extracto proteico obtenido de cada tratamiento fue utilizado para determinar la concentración de proteínas con el kit Quick Start Bradford 1X Dye Reagent (BioRad), que se realizó en microplacas con 5 μ L de control o muestra y 250 μ L del reactivo 1X por pozo, después de agitar y 5 min de espera se leyó a 600 nm. Primero, se realizó una curva de calibración con albúmina de suero bovino (BSA) en concentraciones de 0.5 μ g/ μ L a 4 μ g/ μ L. Después, se determinó la

concentración de proteínas de los extractos y estos fueron utilizados para la realización del western blot (Fig. 11).

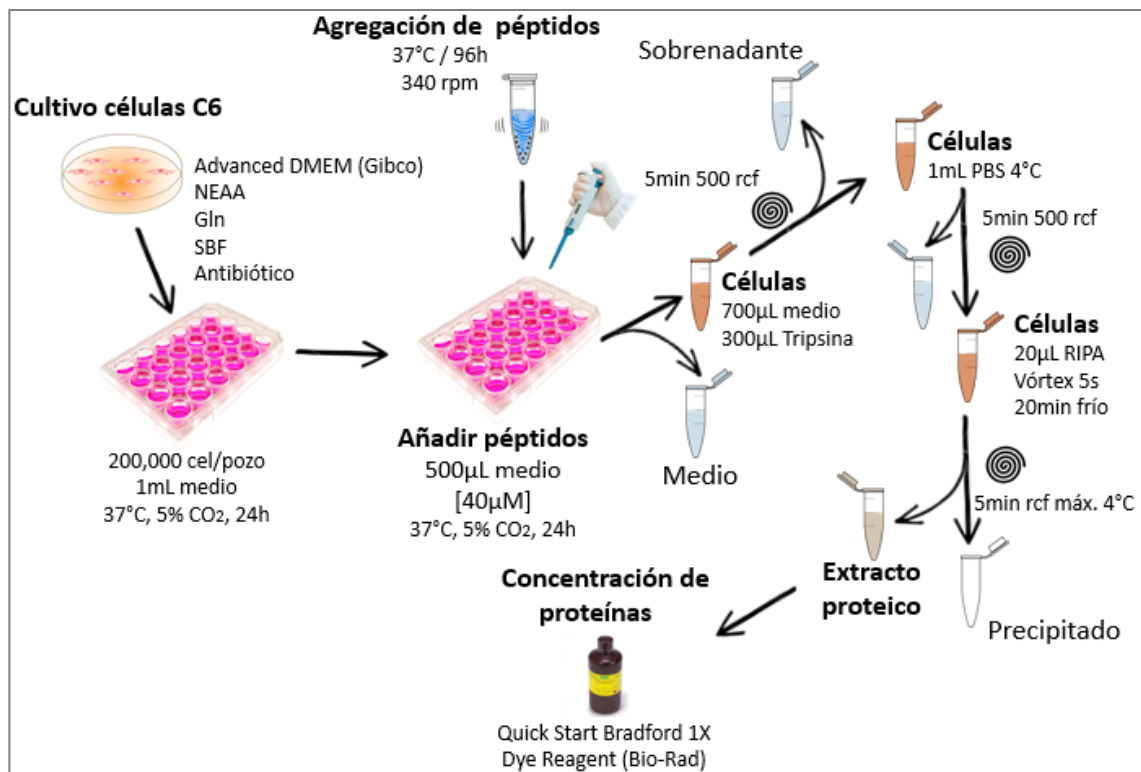


Figura 11. Esquema de la extracción de proteínas: Las células fueron cultivadas en placas de 24 pozos y tratadas con los agregados de los distintos péptidos y el péptido WT sin agregar. Para la extracción se utilizó RIPA y luego se determinó la concentración de proteínas.

5.3.2 Western blot y tinción de plata

Los extractos proteicos fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% a 100 V por 1 h 45 min, se cargaron 8 µg de proteína por muestra. Se corrieron dos geles en la misma cámara de electroforesis y uno de estos geles fue utilizado para realizar la tinción con plata con el kit Silver Stain Plus Kit (BioRad), que sirvió para determinar la presencia de proteínas en el gel

y el otro fue utilizado para detectar agregados oligoméricos por western blot (Fig. 12).

5.3.2.1 Tinción de plata

Para la tinción de plata el gel se incubó 20min en una solución fijadora (metanol 50% V/V, ácido acético 10% V/V, solución fijadora 10% V/V y agua milli-Q 3% V/V), luego se lavó dos veces con 400 mL de agua milli-Q por 10 min en agitación. Para la tinción se utilizó la solución del complejo de plata, la solución moderadora de reducción y el reactivo de desarrollo de imagen, según especificaciones del kit (5 mL de cada una en 35 mL de agua milli-Q más 50 mL de la solución aceleradora), el gel fue incubado en la solución preparada por 20 min en agitación. Finalmente, el gel fue lavado con agua milli-Q por 5 min y se detuvo la reacción con ácido acético al 5% por 15 min. El gel fue observado en el fotodocumentador para evidenciar la presencia de proteínas.

5.3.2.2 Western blot

El otro gel fue utilizado para transferir a una membrana de PVDF con el equipo Semi dry blot system (BioRad) a 10 V por 15 min, luego a 15 V por 10 min y finalmente a 20 V por 5 min. Las membranas fueron bloqueadas en PBS y leche sin grasa 5% por 12 h a 4°C. Después del bloqueo, las membranas se incubaron por 12 h a 4°C con el anticuerpo primario de conejo anti oligómeros ab126892 (Abcam), en una dilución 1:1000. Luego de lavar con PBS/Tween 0.5%, las membranas fueron incubadas por 12 h a 4°C con el anticuerpo secundario de ratón anti-IgG de conejo-HRP (Santa Cruz), en una dilución 1:1000. Las bandas fueron detectadas por quimioluminiscencia usando el Pierce ECL Western Blotting Substrate kit (Fig. 12).

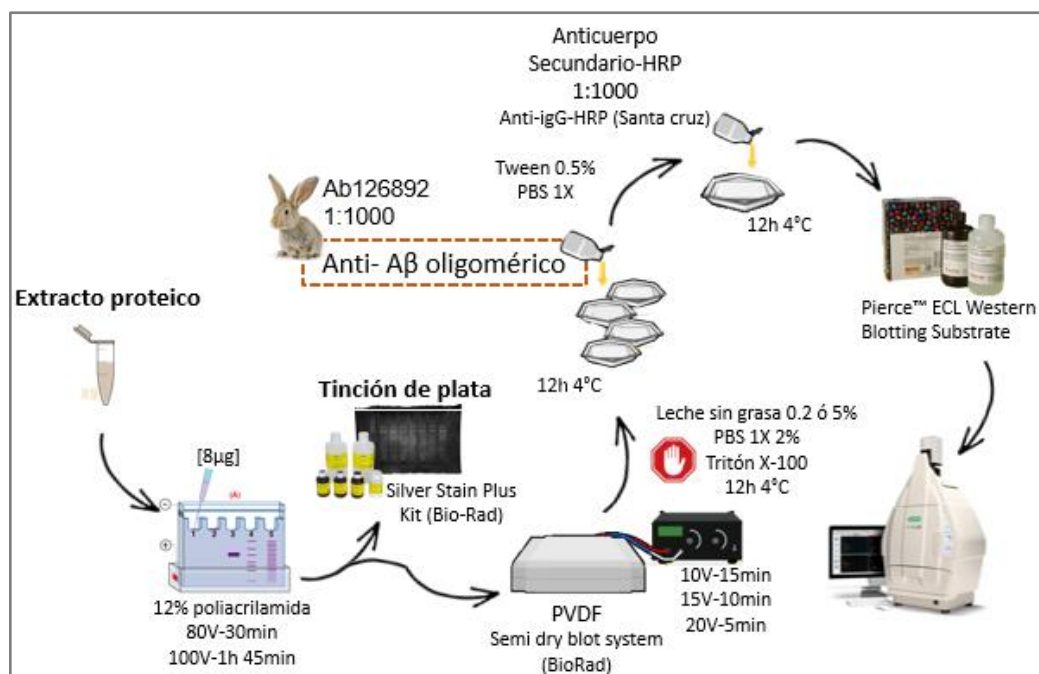


Figura 12. Esquema del western blot: Los extractos proteicos fueron utilizados en las electroforesis en geles de poliacrilamida. Un gel fue teñido con plata para determinar presencia de proteínas y otro gel fue utilizado para realizar western blot.

5.4 Viabilidad celular

5.4.1 Curva de viabilidad

Se sembraron seis puntos por cuadruplicado cada uno (un punto es una cantidad determinada de células) en una placa de 96 pozos, la cantidad de células en cada punto fue la siguiente: 3125, 6250, 12500, 25000, 50000 y 200000. Se colocó solamente medio en tres pozos, para utilizarlos como blanco.

Después de incubar por 24 h a 37°C con 5% de CO₂, se dejó la placa a temperatura ambiente, al igual que el reactivo del kit CellTiter-Glo. Al tener una

temperatura cercana entre la placa y el reactivo, se retiró el medio de los pozos y se añadieron 100 μ L de medio nuevo más 100 μ L de reactivo, luego 30 s de agitación, incubación por 10 min y se realizó la lectura para determinar las URL en cada pozo sembrado. Con los datos obtenidos se realizó la curva de viabilidad y se determinó la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (R^2), con el que se determina la calidad de la curva para replicar los resultados (tiene que ser mayor a 0.98).

Se realizó esta curva con la finalidad de determinar el número de células viables después de los tratamientos con los péptidos a distintos tiempos mediante la aplicación de la ecuación obtenida a partir de la curva.

5.4.2 Efectos de los péptidos sobre la viabilidad celular

Para comprobar que el efecto de los péptidos sobre la viabilidad celular tuviera un comportamiento similar al reportado en el antecedente directo, se llevó a cabo un análisis del efecto sobre la viabilidad celular con los nuevos péptidos resuspendidos con las condiciones que ya se habían reportado en el grupo de trabajo. En dicho análisis se utilizó el kit CellTiter-Glo (Promega), que se basa en la oxidación de la luciferina por la luciferasa, reacción para la que se necesita ATP (el ATP de las células), por lo que las URL son proporcionales a la presencia de ATP.

Para este ensayo, se sembraron 20,000 células por pozo en placas de 96 pozos blancas con fondo claro, se sembraron 18 pozos y en tres se colocó sólo medio (blanco), las células fueron mantenidas a 37°C con 5% de CO₂ por 24 h. Después, se añadieron los péptidos previamente agregados (tres pozos por péptido) a una concentración 40 μ M, a tres pozos se le añadió rotenona (10 μ M) como control de muerte celular y se dejaron tres pozos sin tratamiento. Las

células se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ por 24 h. Se contó con una n de 3 experimentos.

Después de la incubación, cada placa se dejó a temperatura ambiente por 30 min, se retiró el medio de todos los pozos y se añadieron 100 µL de medio nuevo más 100 µL del reactivo luminiscente (todos a temperatura ambiente). En el lector de placas se realizó una agitación de 30 s para promover la lisis celular y se incubó por 10 min para que la oxidación de la luciferina se llevara a cabo, luego se leyeron las URL. Después, se graficó el número de células medio por cada tratamiento y se obtuvieron las desviaciones estándar (DE), para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de una vía con corrección de Bonferroni (Fig. 13).

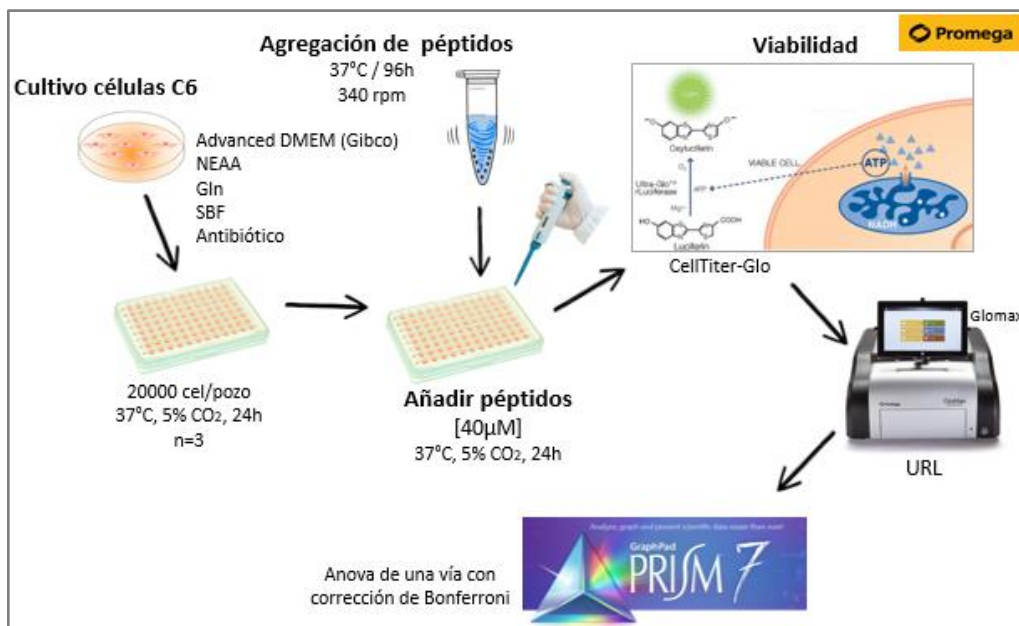


Figura 13. Esquema de la evaluación del efecto sobre la viabilidad del Aβ(25-35) WT y variantes: Se utilizó el kit CellTiter-Glo(Promega), que se basa en la oxidación de la luciferina por la luciferasa, utilizando el ATP celular, por lo que las URL se relacionan con la cantidad de ATP presente y por lo tanto, con el número de células vivas.

5.5 Apoptosis

Para evaluar el efecto de los péptidos sobre la actividad de caspasas efectoras se utilizó el kit ApoTox-Glo Triplex Assay (Promega), para lo que se utilizó Rotenona (Rot) como un control positivo de apoptosis.

Se sembraron 20,000 células por pozo en placas de 96 pozos negras con fondo claro, se sembraron 42 pozos y en tres se colocó sólo medio (blanco), las células se mantuvieron a 37°C con 5% de CO₂ por 24 h. Después, se añadieron los tratamientos y control positivo, para lo que se siguió este orden: tres pozos por tratamiento (un tratamiento por péptido, se hicieron tres repeticiones), tres sin tratamiento y tres con Rot (5 µM) como control de apoptosis. Las células se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ por 12 h y 24 h (ensayos a dos tiempos distintos) (Fig. 14).

Para determinar la actividad de caspasas efectoras, al tratar las células con el péptido Aβ(25-35) y sus variantes se añadió el reactivo Caspase-Glo 3/7 (100µL), se agitó a 300 rpm por 30 s y se dejó incubar 1 h. Este reactivo contiene un sustrato de caspasas efectoras (DEVD) unido a luciferina, por lo que, al escindir el sustrato por acción de las caspasas, se liberó la luciferina y quedó disponible para ser oxidada por la luciferasa, así que se midieron URL, que fueron proporcionales a la actividad de caspasas 3/7 (Fig. 15).

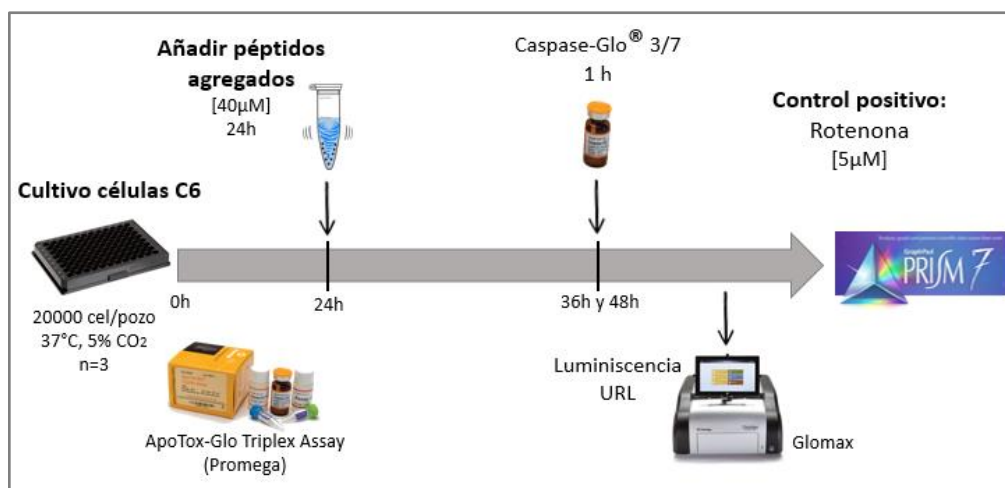


Figura 14. Esquema de la evaluación del efecto sobre la actividad de caspasas del A β (25-35) WT y variantes: Se utilizó el kit ApoTox-Glo Triplex Assay (Promega), con el que se evaluó la actividad de caspasas efectoras por luminiscencia, un indicador de apoptosis.

5.6 Vía de autofagia

Para determinar el efecto sobre la vía de autofagia de los distintos péptidos y si éste es distinto entre las variantes y el WT se evaluó el cambio de LC3I a LC3II (por su unión a fosfatidiletanolamina) por western blot. Se cultivaron 500,000 células por pozo en placas de 24 pozos con 1 mL de medio y se incubaron por 24 h a 37°C con 5% de CO₂, después, el medio fue reemplazado por 500 µL de medio nuevo y los péptidos previamente agregados fueron añadidos a una concentración de 40 µM, nuevamente se incubó por 24 h a 37°C con 5% de CO₂. Los tratamientos fueron los siguientes: agregados de A β (25-35) WT, A30W, K28A y M35C (un tratamiento por péptido), rapamicina 0.5 µM (Rap) como control positivo y un grupo de pozos sin tratamiento. Por cada tratamiento se contó con tres pozos, después del tiempo de incubación se realizó la extracción de proteínas. Todos los tratamientos fueron aplicados solos y con cloroquina (Cq) 30 µM por 4 h, que es un inhibidor de la degradación de autofagosomas, con el objetivo de provocar la acumulación de estos.

5.6.1 Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas intracelulares se retiró el medio de los pozos después de tratar con los distintos péptidos y se reservó en tubos eppendorf de 2 mL. Luego se lavó cada pozo con 500µL de PBS a 4°C. Finalmente, se añadieron 20 µL de RIPA a 4°C en cada pozo y se raspó para desprender las células del fondo. El contenido del tubo fue colocado en un tubo de 2 mL (un tubo por tratamiento) y los tubos fueron agitados 5 s en vórtex e incubados 20 min en frío, se centrifugó por 10 min a rcf máximas a 4°C y el sobrenadante de cada tubo fue transferido a tubos nuevos (extracto proteico), el precipitado fue reservado (Fig. 11).

El extracto proteico obtenido de cada tratamiento fue utilizado para determinar la concentración de proteínas con el kit Quick Start Bradford 1X Dye Reagent (BioRad), que se realizó en microplacas con 1 µL de control o muestra y 200 µL del reactivo de Bradford 1X por pozo, después de agitar y 5 min de espera se leyó a 600 nm. Se determinó la concentración de proteínas de los extractos y estos fueron utilizados para la realización del western blot.

5.6.2 Western blot y tinción de plata

Los extractos proteicos fueron hervidos por 5 min y separados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 15%, con una pre-corrida de 30 min a 100 V por 1 h 45 min. Después de cargar las muestras en una proporción 1:1 con el buffer de carga se llevó a cabo la electroforesis, que inició a 80 V por 30 min y continuó a 115 V por 2 h, se cargaron 10 µg de proteína por muestra. Se corrieron dos geles en la misma cámara de electroforesis y uno de estos geles

fue utilizado para realizar la tinción con plata con el kit Silver Stain Plus Kit (BioRad), que sirvió para determinar la presencia de proteínas en el gel y el otro fue utilizado para transferir a membrana de PVDF (Fig. 12).

5.6.2.1 Tinción de plata

Para la tinción de plata el gel se incubó 20 min en una solución fijadora (metanol 50% V/V, ácido acético 10% V/V, solución fijadora 10% V/V y agua milli-Q 3% V/V), luego se lavó dos veces con 400 mL de agua milli-Q por 10 min en agitación. Para la tinción se utilizó la solución del complejo de plata, la solución moderadora de reducción y el reactivo de desarrollo de imagen, según especificaciones del kit (5 mL de cada una en 35 mL de agua milli-Q más 50 mL de la solución aceleradora), el gel fue incubado en la solución preparada por aproximadamente 20 min en agitación. Finalmente, el gel fue lavado con agua milli-Q por 5 min y se detuvo la reacción con ácido acético al 5% por 15 min. El gel fue observado en el fotodocumentador para evidenciar la presencia de proteínas.

5.6.2.2 Western blot

El otro gel fue utilizado para transferir a una membrana de PVDF con el equipo Semi dry blot system (BioRad) a 10 V por 15 min, luego a 15 V por 10 min y finalmente a 20 V por 5 min. Las membranas fueron bloqueadas en PBS y leche sin grasa 5% por 12 h a 4°C. Después del bloqueo las membranas se incubaron por 12 h a 4°C con el anticuerpo primario de conejo anti LC3 (Abcam), en una dilución 1:1000. Luego de lavar con PBS/Tween 0.5%, las membranas fueron incubadas por 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario de ratón anti-IgG de conejo-HRP (Santa Cruz), en una dilución 1:1000. El mismo procedimiento se siguió con el control de carga, utilizando el anticuerpo primario anti-GAPDH. Las bandas fueron detectadas por quimioluminiscencia usando el Pierce ECL Western Blotting Substrate kit y para el análisis densitométrico se utilizó el software ImageJ (metodología similar a la mostrada en la Figura 12).

CAPÍTULO 6

RESULTADOS

6.1 Caracterización estructural mediante AFM de A β (25-35) WT y variantes

Se analizó la formación de fibrillas de los distintos péptidos, después de diluir a partir de la solución stock (1 ng/ μ L) para el tiempo 0 h y después de la incubación de 12 h a 37°C a 340 rpm. Se observaron agregados característicos del péptido WT que formaban fibrillas cortas desde el primer tiempo (0 h), sin embargo, la longitud de las fibrillas no aumentó demasiado en el segundo tiempo (Fig. 15-A). En el Ra (tabla II) muestra que el grosor de las fibrillas casi no aumentó con el tiempo.

La mutante A30W formó agregados redondos a las 0 h, mientras que a las 12 h se observaron algunos agregados amorfos y fibrillas cortas (Fig.15-C). El Ra muestra que la rugosidad de esos agregados casi se triplicó en el segundo tiempo, indicando la formación de agregados más gruesos (tabla II).

En cuanto a la mutante K28A se observaron agregados amorfos en ambos tiempos, mismos que aumentaron tamaño y grosor en el segundo tiempo respecto al primero (Fig. 15-B), en estos agregados se obtuvo la mayor rugosidad, demostrando que con esta mutación se generan agregados más gruesos (tabla II).

En la mutante M35C se observó la formación de fibrillas cortas en el primer tiempo, sin embargo, después de 12 h de incubación los péptidos se dispersaron de forma homogénea (Fig. 15-D) y el grosor apenas incrementó un poco (tabla II).

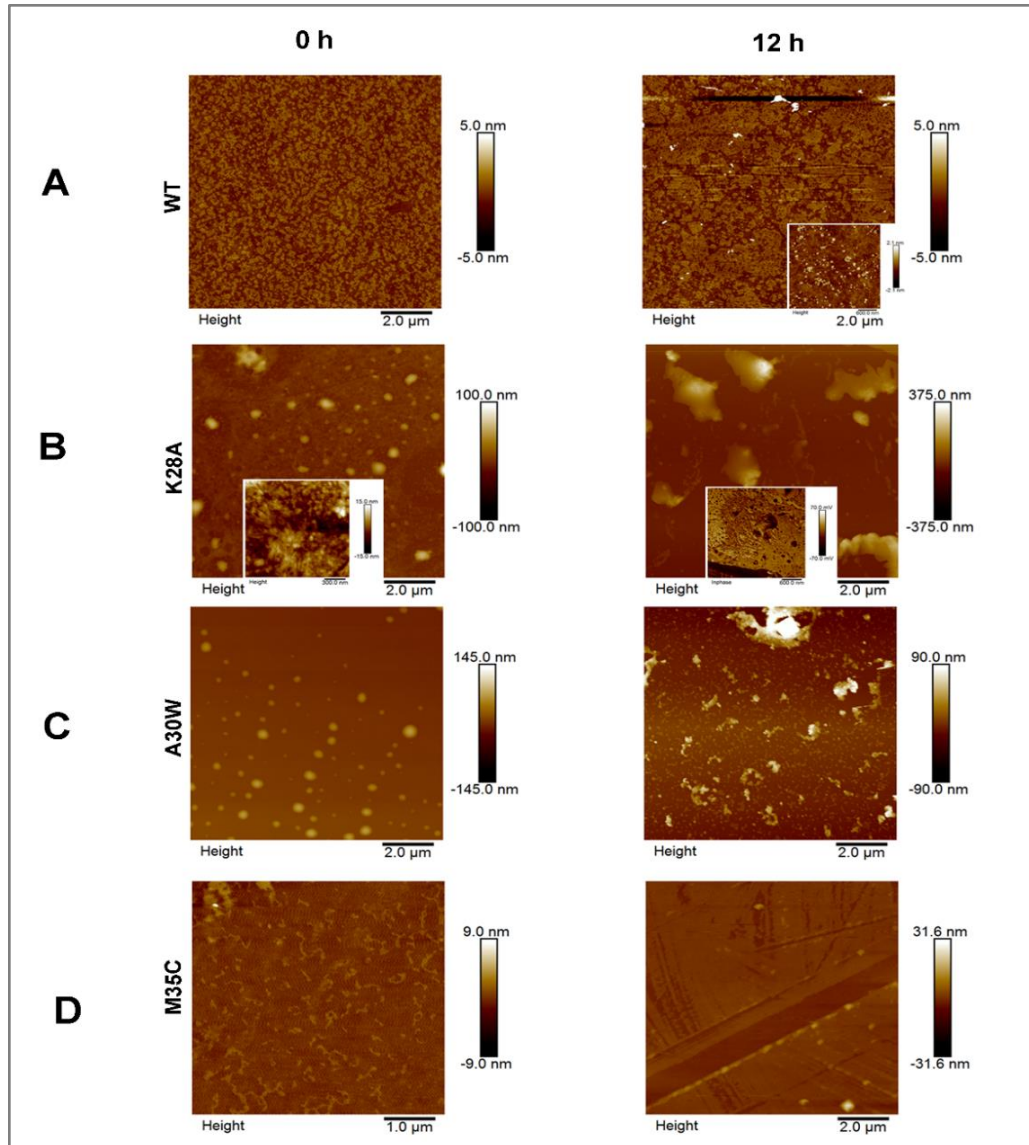


Figura 15. Micrografías obtenidas por AFM de agregados del Aβ(25-35) WT y variantes: Análisis estructural de Aβ(25-35) WT y variantes agregados por 12 h a 37°C/340 rpm y sin agregar (tiempo=0 h). Cada imagen representa 2x2 μm. **A)** Aβ(25-35) WT, **B)** Aβ(25-35) K28A, **C)** Aβ(25-35) A30W y **D)** Aβ(25-35) M35C.

Tabla II. Análisis de rugosidad de los agregados formados por el A β (25-35) WT y variantes.¹

Péptido	Tiempo (h)	Ra (nm)	DE (+/-) (nm)
WT	0	0.61	0.014
	12	0.72	0.083
A30W	0	2.12	1.189
	12	6.79	2.378
K28A	0	4.47	1.234
	12	16.55	9.88
M35C	0	0.43	0.066
	12	0.94	0.369

¹El Ra se calculó como la media aritmética de los valores absolutos de las desviaciones de altura superficial obtenidas a partir del plano medio sobre los 100 cuadrados de 1x1 μm^2 que conforman las imágenes 10x10 μm^2 obtenidas de cada muestra.

6.2 Internalización celular y estado de agregación

6.2.1 Curva de calibración de concentración proteica

Después de realizar la extracción de proteínas se determinó la concentración de los extractos por Bradford, para lo que se realizó una curva de calibración (Fig. 16), para dicha curva se utilizaron concentraciones de BSA de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a 6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y se midió absorbancia a 600 nm, los resultados de estas mediciones se muestran en la tabla III. Luego, con la ecuación obtenida, se determinó la concentración de proteína por cada extracto y se calculó el volumen necesario para cargar 8 μg de proteína.

Tabla III. Medias de absorbancia obtenidas para cada punto de la curva con su desviación estándar.

Proteína (µg/µL)	Media Abs 600 nm	DE
1.0	0.13	0.0154
3.0	0.48	0.0730
4.0	0.62	0.0285
5.0	0.73	0.066
6.0	0.88	0.0207

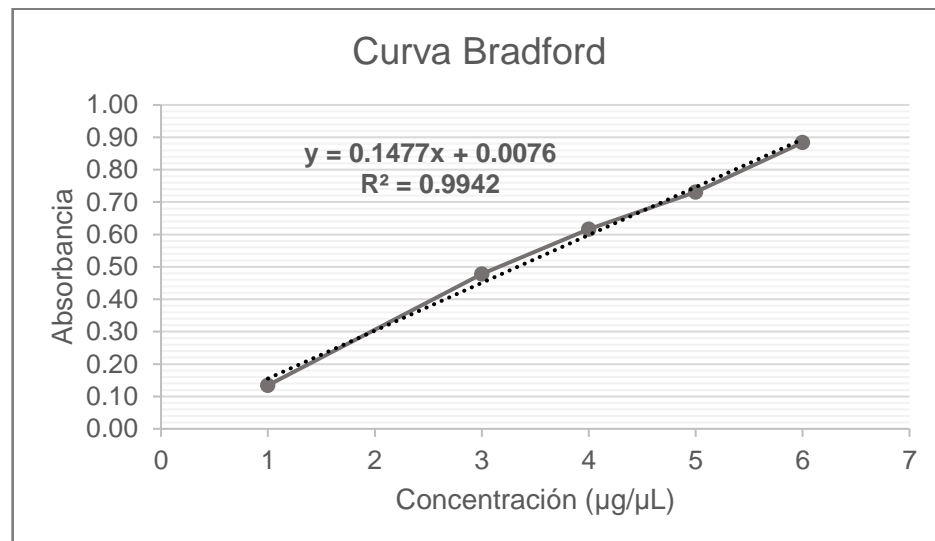


Figura 16. Curva de calibración Bradford: Se observa que el coeficiente de determinación pasa de 0.98 por lo que se puede utilizar la ecuación obtenida a partir de esta curva para determinar la concentración de proteínas de los extractos obtenidos a partir de células tratadas con los agregados de los distintos péptidos.

6.2.2 Tinción de plata y Western blot

En el gel que fue teñido con plata se observa la presencia de proteínas en todos los extractos (Fig. 17-A). Después de realizar la transferencia a la membrana de PVDF e incubar con los anticuerpos primario y secundario se logró visualizar bandas que tenían pesos de entre 30 KDa y 60 KDa en todas las muestras que fueron tratadas con oligómeros, estas bandas fueron más evidentes en el péptido A β (25-35) WT y la mutante M35C, mientras que en el extracto de células que fueron tratadas con el péptido WT soluble se observa la presencia de un par de bandas de alrededor de 50 KDa. Ninguna banda fue encontrada en el extracto de células sin tratamiento (Fig. 17-B).

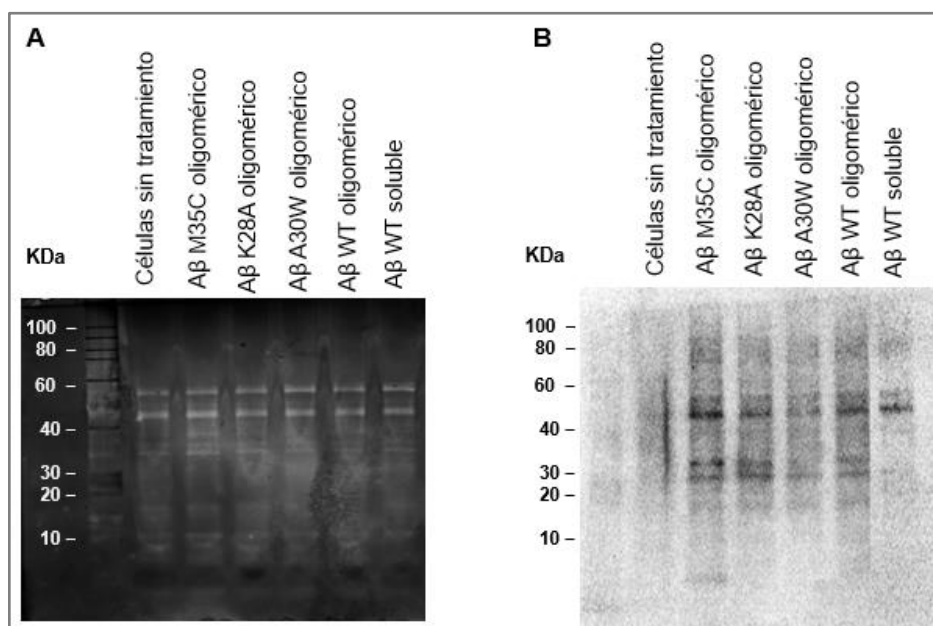


Figura 17. Evaluación la internalización del A β (25-35) WT y variantes y determinación de su estado de agregación: A) Tinción de plata, se observan bandas de distinto peso en todas las muestras, lo que indica la presencia de proteínas. **B)** Western blot, se observan bandas de 30-60 KDa en los extractos de tratamientos con los distintos péptidos agregados, el péptido WT soluble sólo se observan un par de bandas y ninguna banda se observa en el extracto de células sin tratamiento.

6.3 Viabilidad celular

6.3.1 Curva de viabilidad

Después de sembrar los seis puntos de la curva por cuádruplicado e incubar por 24 h a 37°C con 5% CO₂ se realizó el ensayo de viabilidad celular. La cantidad de células por punto fue la siguiente: 3125, 6250, 12500, 25000, 50000 y 200000. Se colocó solamente medio en tres pozos, para utilizarlos como blanco, es decir, que se restó la media de los valores de URL obtenidos en los pozos blanco a cada pozo con células. Después de restar el blanco se determinó la media de cada punto con su DE (Tabla IV). El análisis se realizó con el programa Excel y se obtuvo la curva mostrada en la figura 18.

Con los datos obtenidos se realizó la curva de viabilidad y se determinó la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (R^2), que determina la calidad de la curva para replicar los resultados, tiene que ser mayor a 0.98. En este caso, como se puede observar, el coeficiente de determinación pasa de 0.98, por lo que la ecuación obtenida a partir de esta curva se puede utilizar para determinar el número de células viables después de ser tratadas con los distintos péptidos a diferentes tiempos.

Tabla IV. Media de los valores de URL obtenidos para cada punto de la curva con su desviación estándar.

N° células	Media (URL)	DE
3125	37344.67	282.842712
6250	83931.33	5315.38647
12500	240824.67	41860.7214
25000	393874.67	46612.1944
50000	828974.67	10394.47
200000	2453324.67	707.106781

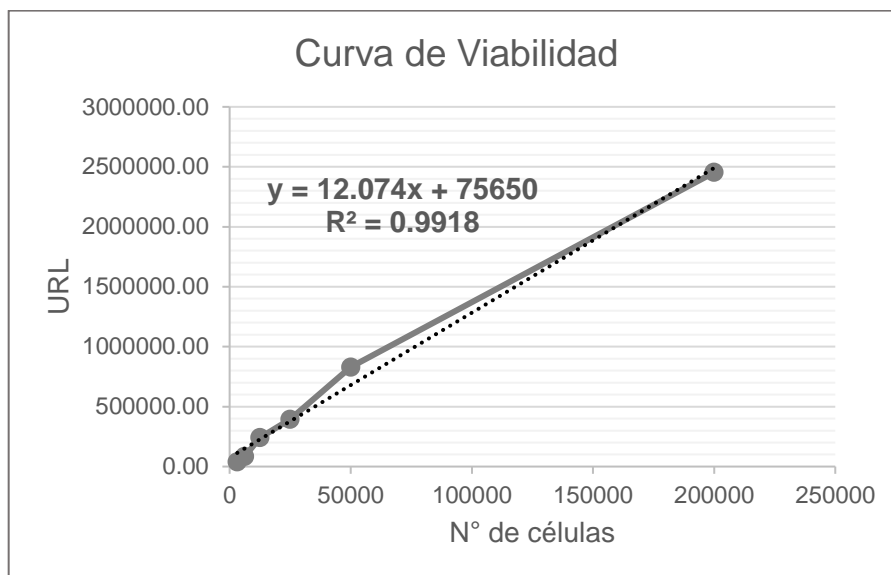


Figura 18. Curva de viabilidad: Se observa que el coeficiente de determinación pasa de 0.98 por lo que se puede utilizar la ecuación obtenida a partir de esta curva para determinar el número de células en experimentos en los que se utilice el mismo kit (CellTiter-Glo. Promega).

6.3.2 Efectos de los péptidos sobre la viabilidad celular

Para comprobar que el efecto de los péptidos sobre la viabilidad celular siguiera un comportamiento similar al reportado en el antecedente directo, se llevó a cabo un análisis del efecto sobre la viabilidad celular, con los nuevos péptidos resuspendidos, con las condiciones que ya se habían reportado en el grupo de trabajo. Para determinar el número de células medio (Tabla V), se utilizó la ecuación reportada en la figura 19. Se realizó un análisis de ANOVA de una vía con corrección de Bonferroni ($P < 0.05$). En dicho análisis no se observaron diferencias significativas entre los efectos sobre la viabilidad celular de cada péptido (Fig. 19). Por lo que se pudo continuar con la realización de los ensayos para evaluar los efectos sobre la viabilidad, citotoxicidad y apoptosis de los distintos péptidos.

Tabla V. Media del número de células por tratamiento con su desviación estándar.

Tratamiento	Media (N° de células)	DE
WT	75865.16	6728.948822
A30W	81886.37	7362.520228
K28A	70186.30	6773.71865
M35C	77182.04	7182.229672
Rotenona (10µM)	1409.17	127.0847867
Control (ST)	102536.80	1407.984098

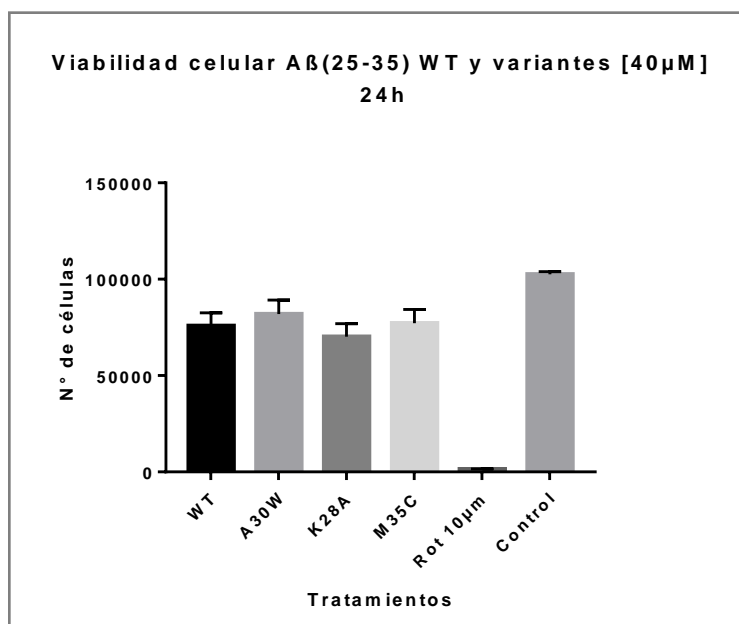
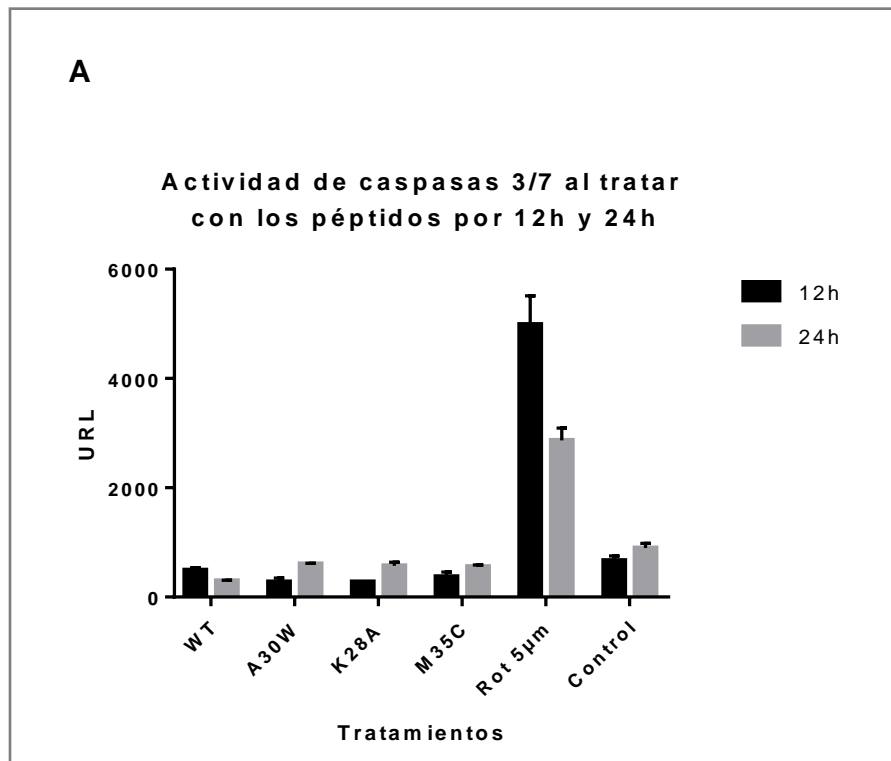


Figura 19. Efecto de los distintos péptidos sobre la viabilidad celular a 24 horas: Se observa que no hay diferencias significativas entre los efectos sobre la viabilidad observados al tratar las células con los distintos péptidos previamente agregados, considerando una $P < 0.05$.

6.4 Apoptosis

Para determinar el efecto de los péptidos sobre la actividad de caspasas se hicieron ensayos a tiempos de 12 h y 24 h, se obtuvieron las gráficas mostradas en la figura 20. Se observaron diferencias significativas en la actividad de caspasas a las 24 h, al comparar el péptido WT con las mutantes. Al comparar las URL (proporcional a la actividad de las caspasas efectoras) obtenidas para cada péptido en los dos tiempos (Fig. 20-B) se observó un aumento de la actividad de caspasas a las 24 h con todas las mutantes, obteniendo diferencias significativas con las mutantes A30W y K28A, mientras que la actividad de caspasas disminuyó al segundo tiempo con el WT. Para los análisis estadísticos se realizó el análisis de ANOVA de una vía con corrección de Bonferroni ($p < 0.05$).



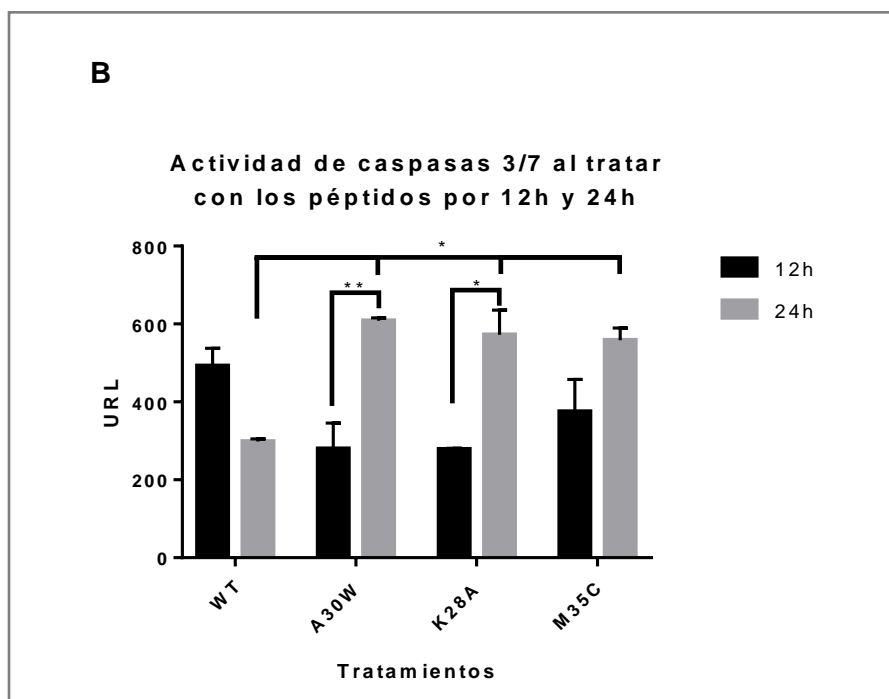


Figura 20. Efecto de los péptidos sobre la actividad de caspasas 3/7 a 12 y 24 horas: **A)** Efecto sobre la actividad de caspasas efectoras, como el resultado del control de rotenona fue muy alto, se graficaron los resultados obtenidos con los distintos péptidos. **B)** No se observaron diferencias significativas en un tiempo de 12 h de tratamiento, mientras que a las 24 h se observaron diferencias significativas del péptido WT con las mutantes. Todas las mutantes presentaron un aumento en la actividad de caspasas 3/7 a las 24 h, que fue significativo para A30W y K28A. El péptido silvestre presentó una mayor actividad a las 12 h.

6.5 Vía de autofagia

Después de tratar las células y realizar la extracción de las proteínas intracelulares se determinó la concentración proteica de cada muestra con la ecuación mostrada en la figura 16 y se calculó el volumen necesario para cargar 10 µg de proteína. La presencia de proteínas se confirmó con las tinciones de plata mostradas en la figura 21 y después de transferir a membranas de PVDF e incubar con los anticuerpos primario y secundario para

LC3 y GAPDH, se logró visualizar bandas que tenían pesos de entre 16 y 18 KDa para LC3 I, 14 y 16 KDa para LC3 II y 37 KDa para GAPDH (Fig. 22). En la figura 22-A se muestra que al no usar Cq (Cq⁻) la banda que corresponde a LC3II es más evidente en el control con Rap, mientras que al usar el inhibidor (Cq⁺) la banda de LC3 II se hace más evidente en muestras de células tratadas con A30W, K28A y Rap (Fig 22-B), indicando la formación de autofagosomas.

Al hacer el análisis densitométrico, se observó que, sin el inhibidor, el porcentaje de la relación LC3 II/I es menor en el péptido WT y la mutante M35C al comparar con el control sin tratamiento (Fig. 22-C). Al utilizar el inhibidor, se observó que este efecto se mantiene para dichos péptidos, sin embargo, el porcentaje de la relación LC3 II/I obtenido al tratar con A30W y K28A fue mayor al comparar con el control Cq⁺ (Fig. 22-D). Las gráficas se realizaron considerando la relación LC3 II/I de los controles sin y con Cq como el 100%.

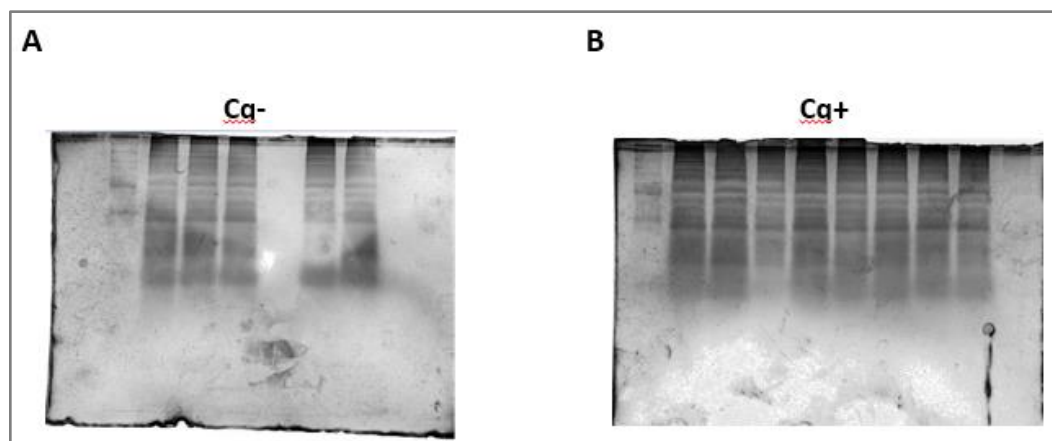


Figura 21. Tinciones de plata: **A)** Tinción de plata de gel con muestras sin Cq (Cq⁻). **B)** Tinción de plata de gel con muestras con Cq (Cq⁺).

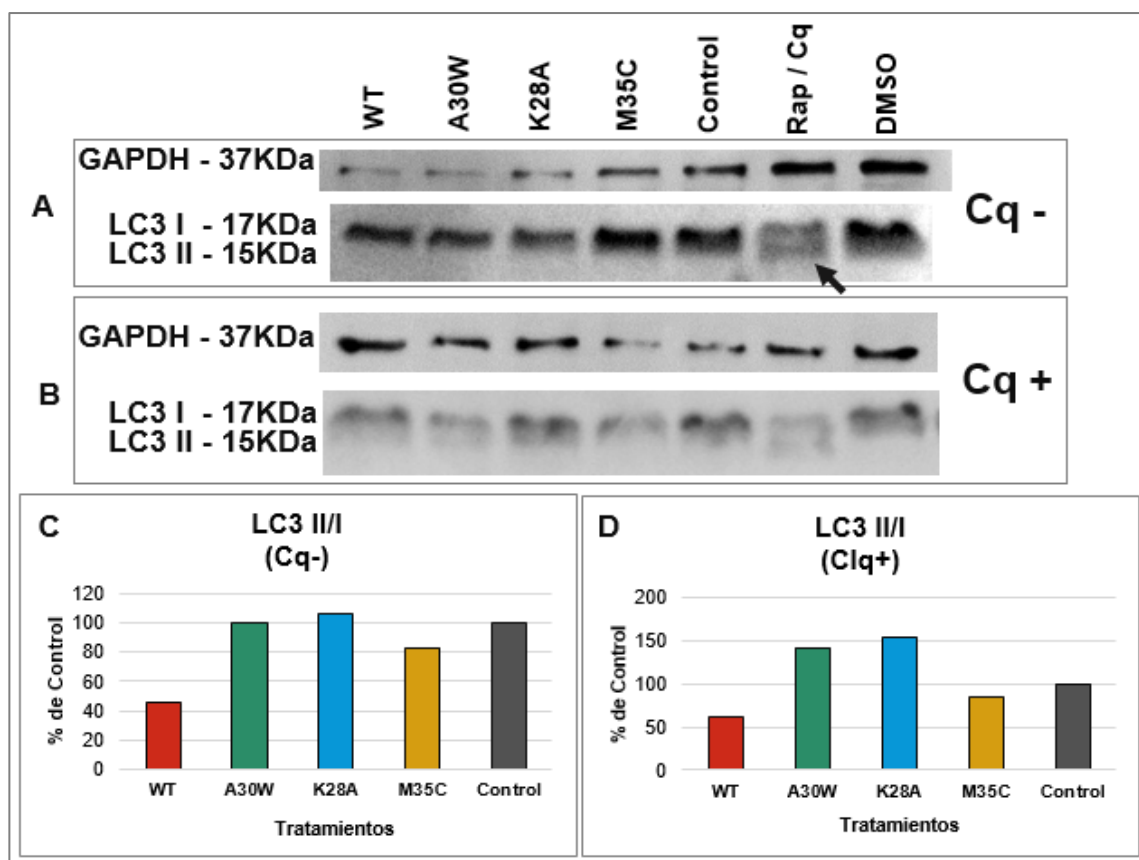


Figura 22. Efecto de los péptidos sobre la vía de autofagia: **A)** Western blot con muestras de células sin Cq. Se observa la presencia de la banda correspondiente a LC3 II en las muestras control positivo (Rap⁺/Cq⁺, marcada con flecha), mientras que con el resto de los tratamientos no es tan evidente. **B)** Western blot con muestras Cq⁺. Se observa la banda correspondiente a LC3 II en las muestras de células tratadas con A30W, K28A y Rap. **C)** Relación LC3 II/I en porcentaje de células Cq⁻. Se observa que la relación LC3 II/I de WT y M35C fue menor a la del control sin tratamiento. **D)** Relación LC3 II/I en porcentaje de células Cq⁺. Se observa que la relación LC3 II/I de los grupos WT y M35C continúa por debajo del control Cq⁺, mientras que con A30W y K28A es mayor. Las gráficas se realizaron considerando los controles sin tratamiento (Cq⁻ y Cq⁺) como el 100%.

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN

Monómeros del A β pueden formar agregados de diferente tamaño, incluyendo oligómeros, protofibrillas y fibrillas maduras. Las fibrillas son de mayor tamaño que el resto de los agregados y pueden depositarse en las placas amiloides, mientras que los oligómeros son solubles y pueden distribuirse en el cerebro [40]. En modelos estructurales derivados de NMR se ha observado que el péptido A β se encuentra en un estado conformacional de α -hélice y puede cambiar a lámina β -plegada en medios similares a la membrana [88].

El péptido A β (25-35) es el derivado más tóxico del β amiloide y tiende a agregarse formando fibrillas [44, 89], como se observó en la caracterización por AFM de los agregados del péptido WT en los tiempos evaluados, pues se formaron fibrillas cortas desde el primer tiempo (0 h), sin embargo, no se observó un gran cambio en la longitud de las fibrillas en el segundo tiempo (Fig. 15-A). El Ra (tabla II) muestra que el grosor de las fibrillas no aumentó con el tiempo. Esto podría indicar, que al aumentar el tiempo de la agregación del péptido WT se aumente la longitud de las fibrillas observadas en los tiempos reportados. Algunos autores reportan la formación de fibrillas maduras en un tiempo de 7 y 12 horas, utilizando AFM, sin embargo, en estos estudios el A β fue resuspendido en PBS o disuelto en hexafluoroisopropanol (HFIP) e incubado a 37°C sin agitación [90, 91] y a diferencia de esta metodología, en este trabajo los péptidos fueron incubados en agitación, por lo que las diferencias en la agregación pueden deberse a la metodología.

Estudios anteriores a éste, han reportado la generación de inhibidores de la agregación del péptido A β basados en su secuencia aminoacídica. Estas modificaciones pueden ser desde la sustitución de residuos, metilaciones y sustitución por enantiómeros, hasta el cambio de uno o más aminoácidos por otros con características distintas [92, 93, 94, 82, 95]. En este trabajo se utilizaron las variantes A30W, K28A y M35C del péptido A β (25-35), estas variantes fueron diseñadas *in silico* (fig. 6) [96].

La mutante A30W formó agregados redondos a las 0 h, mientras que a las 12 h se observaron fibrillas cortas (Fig.15-C) y el Ra muestra que la rugosidad de esos agregados casi se triplicó en el segundo tiempo, indicando la formación de agregados más gruesos (tabla II). Por el modelado molecular se espera que la longitud de las fibrillas cortas observadas a las 12 h de agregación no aumente con el tiempo ya que la mutación del triptófano por alanina genera un impedimento estérico en una zona de plegamiento, teniendo efecto en la forma de los agregados y la rugosidad, que fueron distintas a lo observado con el A β WT. Esta mutante no había sido reportada para ninguna forma del péptido A β , siendo éste el primer reporte de caracterización estructural para la mutación A30W en el péptido A β (25-35) [96].

En la mutante K28A, se observaron agregados amorfos en ambos tiempos, mismos que aumentaron tamaño y grosor en el segundo tiempo respecto al primero (Fig. 15-B). Se observaron diferencias en la forma de los agregados y su rugosidad al comparar con el A β WT, obteniendo una mayor rugosidad, demostrando que con esta mutación se generan agregados más gruesos (tabla II). Aunque este es el primer reporte de caracterización estructural para la mutante en el fragmento A β (25-35), la modificación K28A ya ha sido reportada en A β (40) y A β (42) por Sinha y cols [84], lo que se pretendía era disminuir la formación de agregados con base en el papel que tienen los residuos de Lys en la agregación, pues se ha reportado que al ser un aminoácido básico, puede formar un puente salino con Asp23 [86]. De esta forma, al cambiar la carga se

espera que estos agregados amorfos aumenten en tamaño sin que se lleguen a formar fibrillas.

En la mutante M35C se observó la formación de fibrillas cortas en el primer tiempo, sin embargo, después de 12 h de incubación los péptidos se dispersaron de forma homogénea (Fig. 15-D) y el grosor incrementó muy poco (tabla II). Debido a antecedentes previos en las cinéticas de agregación con tioflavina-s, en los que se reporta la formación de agregados de tipo amiloide a las 15h para esta mutante en A β (40) [85], es posible que se lleguen a formar fibrillas al aumentar el tiempo, ya que esta mutación se realizó con la finalidad de observar el mecanismo de citotoxicidad del péptido, específicamente de la metionina 35, que tiene un papel crítico al ser susceptible a la oxidación y consecuente producción de radicales libres a partir del azufre [85], más que evitar la formación de fibrillas. La eliminación de la Met o su sustitución por Nle, Leu, Lys, Val y Tyr en A β (25-35), inhibe la agregación y toxicidad del péptido [89, 97]. Sin embargo, al sustituir por Cys no se observaron los mismos efectos, lo que podría deberse a que la cisteína también contiene azufre y se ha reportado que el oxígeno del grupo carbonilo de la Ile31 interactúa con el azufre de la Met, teniendo implicaciones en el cambio conformacional y la producción de radicales libres [98].

En este trabajo se observó por primera vez que mutantes del péptido A β pueden internalizarse, al igual que el WT. Se ha reportado que A β (40) y A β (42) pueden internalizarse vía endocitosis [99] y que agregados de A β pueden interactuar con la membrana y unirse a diferentes receptores como: el receptor de taquiquinina, el receptor de neurotrofina p75 (P75NRT), proteína relacionada con receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP), receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR5), subunidad α que contiene receptor nicotínico de acetilcolina (α 7nAChR) y el receptor de N-metil-D-aspartato (NMDAR), entre otros [100, 101, 40]. Además, por dinámicas moleculares se observó que

A β (25-35) puede agregarse y formar un barril β que se mantiene en membranas, teniendo la K28 un papel clave en la formación de este poro [102].

Hay evidencias que sugieren que la presencia de agregados oligoméricos e intermediarios prefibrilares del péptido A β son responsables del daño neuronal. Por estudios con modelos *in vivo* y en pacientes, los agregados oligoméricos se han relacionado con deterioro cognitivo, supresión de sinapsis y pérdida de memoria en EA, esta relación fue mayor que al comparar estos efectos con placas amiloides y con A β en estado monomérico [103, 104, 105, 106, 107, 108].

La formación de agregados oligoméricos heterogéneos a partir del péptido A β es característica en EA, esta diferencia en la formación de oligómeros se debe a que A β puede formar agregados de diferentes tamaños, dependiendo del número de monómeros que los conformen, modificaciones post-traduccionales y de las isoformas del A β que los compongan [109, 110, 111, 112].

En este estudio se determinó que estos agregados se encontraban en estado oligomérico con pesos moleculares que oscilaban entre 30 y 60 KDa (Fig. 17). El anticuerpo que se utilizó (ab126982 de Abcam) detecta oligómeros desde 15 KDa hasta 84 KDa aproximadamente. También se observó que el péptido WT en estado monomérico fue internalizado en forma de oligómeros con pesos aproximados de 50 KDa, lo cual comprueba lo observado en las imágenes de AFM a un tiempo de 0 horas de agregación: que el péptido puede agregarse desde tiempo muy cortos (Fig. 15-A). Sin embargo, las condiciones por las que los oligómeros son internalizados necesitan evaluarse para determinar el mecanismo de internalización.

En trabajos previos se ha reportado que el péptido A β puede inducir muerte celular por apoptosis, pues se han evaluado marcadores de apoptosis como: permeabilidad de la membrana, fragmentación de DNA y actividad de proteínas

proapoptóticas, observando un aumento en estos marcadores [80, 113, 114, 115]. En este trabajo los péptidos mutados mostraron una mayor actividad de caspasas 3/7 en un tiempo de 24 horas, mientras que el WT tuvo una mayor actividad de caspasas efectoras a un tiempo de 12 horas (Fig. 20-B), esto podría indicar que el péptido WT se relaciona con una apoptosis más temprana que las mutantes o que la muerte celular sea consecuencia de otro mecanismo, pero, debido a reportes previos se espera que la muerte se presente por apoptosis. No se ha reportado que mutantes del péptido A β pueden inducir la activación de caspasas efectoras, sin embargo, aún resta evaluar la actividad de caspasas a distintos tiempos y otros marcadores de apoptosis.

Algunos eventos críticos en apoptosis son el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial, acompañados de un aumento en el flujo y de la disrupción del potencial de membrana mitocondrial y la liberación del citocromo c, que inicia con la activación de las caspasas al formar el apoptosoma, proceso que conlleva a los eventos característicos de la muerte por apoptosis [80, 116, 117, 118]. Por lo que también restaría evaluar el nivel de calcio intracelular y la disfunción mitocondrial.

En cuanto a la vía de autofagia, se ha reportado una alteración de esta vía en diferentes patologías como cáncer y enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la EA [119, 120]. En esta vía, se presenta la activación de diferentes proteínas en tres etapas: iniciación, elongación y maduración, seguidas de la fusión de los autofagosomas con lisosomas para formar autolisosomas [75, 121]. Una de las proteínas características de la vía de autofagia es la cadena ligera de la proteína 1 asociada a microtúbulos (LC3), que al formarse los autofagosomas se une a fosfatidiletanolamina, conocida como LC3 II, este cambio conformacional de LC3 I a LC3 II puede ser detectado mediante western blot, sin embargo, los resultados obtenidos dependen de la etapa del flujo en la que se encontraban las células al realizar la extracción de proteínas, es por eso que se recomienda el uso de un inhibidor de la degradación de

autofagosomas, en este caso cloroquina (Cq) para producir la acumulación de estas vesículas y poder cuantificar de mejor forma la presencia de LC3 II [121, 122, 123].

En este trabajo se observó que en ausencia de Cq (Cq-) la banda que corresponde a LC3 II es más evidente en el control con Rap (Fig. 22-A), mientras que en presencia del inhibidor (Cq+) la banda de LC3 II se hace más evidente en muestras de células tratadas con A30W, K28A y Rap (Fig 22-B). El análisis densitométrico mostró que sin el inhibidor el porcentaje de la relación LC3 II/I es menor en el péptido WT y la mutante M35C al comparar con el control sin tratamiento (Fig. 22-C). En presencia del inhibidor se observa que este efecto se mantiene para dichos péptidos, sin embargo, el porcentaje de la relación LC3 II/I obtenido al tratar con A30W y K28A fue mayor al comparar con el control más Cq (Fig. 22-D). Según reportes sobre el análisis de western blot de LC3, esto podría indicar que el péptido WT y la mutante M35C inhiban la formación de los autofagosomas, y que las mutantes A30W y K28A activen esta vía [124].

Estudios recientes en el cerebro de pacientes con EA o demencia tipo Alzheimer mostraron una reducción en la formación de autofagosomas junto con una hiperactivación de la vía PI3K/Akt/mTOR, que inhibe la formación de autofagosomas [125, 126, 75, 127], lo que podría explicar la posible inhibición de los péptidos WT y M35C. Sin embargo, otros estudios reportan la acumulación de autofagosomas en EA y en modelos *in Vitro* [79, 80, 128, 126], lo que podría deberse a una inhibición de la degradación de estas vacuolas por la oxidación de proteínas como consecuencia del estrés oxidativo. Fan [79] reporta una inhibición de la vía PI3K/Akt/mTOR, por lo que podría ser que las mutantes A30W y K28A inhiban esta vía, induciendo así la vía de autofagia. Este es el primer reporte y la primera aproximación sobre los efectos que tienen mutantes del péptido A β (25-35) sobre la vía de la autofagia.

La vía PI3K/Akt/mTOR también se relaciona a apoptosis, ya que Akt puede inhibir a Bad y FOXO (que regula la transcripción de Bim), al fosforilarlas y hacerlas reconocibles para otras proteínas que las mantienen inactivas [80, 129, 130]. Éstas, son proteínas proapoptóticas, por lo que, si A30W y K28A inhiben a esta vía, la actividad de caspasas 3/7 observada podría ser efecto de esta inhibición.

Millucci y cols [101] mencionan que el estudio de las propiedades conformacionales del péptido A β en su forma soluble, constituye un enfoque básico para el diseño de moléculas con actividad anti-amiloide, cuya finalidad sea el desarrollo de terapias para la EA. Estas propiedades están determinadas principalmente por la secuencia aminoacídica del péptido A β , por lo que el entendimiento del papel que tienen ciertos aminoácidos en el cambio conformacional y agregación de este péptido también es relevante para esclarecer los mecanismos por los que el A β afecta a las células.

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

Las mutaciones puntuales A30W y K28A realizadas en el péptido A β (25-35), no evitan la agregación, pero sí provocan un efecto distinto sobre las características estructurales de los agregados formados. El Ra de la mutante M35C fue el más cercano al obtenido con el péptido WT.

Se determinó que los péptidos agregados por 96 horas pueden internalizarse en células de la línea C6 de glioblastoma de rata y que estos agregados internalizados son oligómeros, por lo que los agregados oligoméricos del péptido A β (25-35) y sus variantes pueden ser citotóxicos por su internalización en las células.

La actividad de caspasas efectoras fue mayor al tratar las células por 24 horas con las mutantes, mientras que al tratar con el péptido WT se observó una mayor actividad de caspasas efectoras a un tiempo de 12 horas.

Los péptidos WT y M35C podrían inhibir la vía de la autofagia, mientras que A30W y K28A podrían estar activando esta vía.

Los efectos en la actividad de caspasas efectoras y vía de autofagia fueron distintos entre el péptido WT y sus mutantes, sobre todo al comparar con las mutantes A30W y K28A.

Los mecanismos moleculares que se alteran con el péptido A β (25-35) pueden modificarse mediante mutaciones puntuales y estas alteraciones fueron más evidentes con las mutantes A30W y K28A.

CAPÍTULO 9

PERSPECTIVAS

Se plantean como perspectivas realizar la caracterización estructural con tiempos más prolongados de agregación y evaluar la presencia de láminas β por dicroísmo circular. Evaluar la internalización por microscopía y la integridad de la membrana. Además, determinar la actividad de caspasas efectoras en tiempos más prolongados, daría una idea de los tiempos en los que hay más actividad de estas enzimas y se podrían definir los tiempos adecuados para evaluar más marcadores de apoptosis, como: externalización de fosfatidilserina, fragmentación de DNA y disfunción mitocondrial, así como el flujo de calcio. Finalmente, efectos sobre la vía de autofagia se pueden determinar también mediante el uso de microscopía electrónica o de fluorescencia y al evaluar la actividad de la vía PI3K/Akt/mTOR.

CAPÍTULO 10

BIBLIOGRAFÍA

1. *2017 alzheimer's disease facts and figures*, Alzheimer's & Dementia **13** (2017), no. 4, 325-373.
2. C. L. Masters, R. Bateman, K. Blennow, C. C. Rowe, R. A. Sperling and J. L. Cummings, *Alzheimer's disease*, **1** (2015), 15056.
3. M. Prince, Comas-Herrera, A, Knapp, M, Guerchet, M and Karagiannidou, M, "World alzheimer report 2016: Improving healthcare for people living with dementia. Coverage, quality and costs now and in the future," London, 2016.
4. J. A. Schneider, Z. Arvanitakis, S. E. Leurgans and D. A. Bennett, *The neuropathology of probable alzheimer disease and mild cognitive impairment*, Annals of Neurology **66** (2009), no. 2, 200-208.
5. F. M. d. Alzheimer, "Preguntas frecuentes," vol. 2017.
6. I. A. P. Alzheimer México, "La enfermedad," vol. 2017.
7. A. M. Saunders, W. J. Strittmatter, D. Schmechel, P. H. St. George-Hyslop, M. A. Pericak-Vance, S. H. Joo, B. L. Rosi, J. F. Gusella, D. R. Crapper-MacLachlan, M. J. Alberts, C. Hulette, B. Crain, D. Goldgaber and A. D. Roses, *Association of apolipoprotein e allele ϵ 4 with late-onset familial and sporadic alzheimer's disease*, Neurology **43** (1993), no. 8, 1467-1467.
8. L. A. Farrer, L. A. Cupples, J. L. Haines, B. Hyman, W. A. Kukull, R. Mayeux, R. H. Myers, M. A. Pericak-Vance, N. Risch and C. M. van Duijn, *Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein e genotype and alzheimer disease. A meta-analysis. Apoe and alzheimer disease meta analysis consortium*, Jama **278** (1997), no. 16, 1349-1356.
9. D. Scheuner, C. Eckman, M. Jensen, X. Song, M. Citron, N. Suzuki, T. D. Bird, J. Hardy, M. Hutton, W. Kukull, E. Larson, L. Levy-Lahad, M. Viitanen, E. Peskind, P. Poorkaj, G. Schellenberg, R. Tanzi, W. Wasco, L. Lannfelt, D.

- Selkoe and S. Younkin, *Secreted amyloid [beta]-protein similar to that in the senile plaques of alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and app mutations linked to familial alzheimer's disease*, Nat Med **2** (1996), no. 8, 864-870.
10. S. Norton, F. E. Matthews, D. E. Barnes, K. Yaffe and C. Brayne, *Potential for primary prevention of alzheimer's disease: An analysis of population-based data*, The Lancet Neurology **13** (2014), no. 8, 788-794.
 11. L. E. Hebert, J. Weuve, P. A. Scherr and D. A. Evans, *Alzheimer disease in the united states (2010–2050) estimated using the 2010 census*, Neurology **80** (2013), no. 19, 1778-1783.
 12. J. S. Goldman, S. E. Hahn, J. W. Catania, S. Larusse-Eckert, M. B. Butson, M. Rumbaugh, M. N. Strecker, J. S. Roberts, W. Burke, R. Mayeux and T. Bird, *Genetic counseling and testing for alzheimer disease: Joint practice guidelines of the american college of medical genetics and the national society of genetic counselors*, Genet Med **13** (2011), no. 6, 597-605.
 13. C. Cruchaga, S. Chakraverty, K. Mayo, F. L. M. Vulliamy, R. D. Mitra, K. Faber, J. Williamson, T. Bird, R. Diaz-Arrastia, T. M. Foroud, B. F. Boeve, N. R. Graff-Radford, P. St. Jean, M. Lawson, M. G. Ehm, R. Mayeux, A. M. Goate and N. I. A. L. N. F. S. C. for the, *Rare variants in app, psen1 and psen2 increase risk for ad in late-onset alzheimer's disease families*, PLOS ONE **7** (2012), no. 2, e31039.
 14. S.-i. Yoshikai, H. Sasaki, K. Doh-ura, H. Furuya and Y. Sakaki, *Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene*, Gene **87** (1990), no. 2, 257-263.
 15. T. Revesz, J. L. Holton, T. Lashley, G. Plant, B. Frangione, A. Rostagno and J. Ghiso, *Genetics and molecular pathogenesis of sporadic and hereditary cerebral amyloid angiopathies*, Acta neuropathologica **118** (2009), no. 1, 115-130.
 16. I. T. Lott and M. Dierssen, *Cognitive deficits and associated neurological complications in individuals with down's syndrome*, The Lancet Neurology **9** (2010), no. 6, 623-633.
 17. M. a. J. Artiga, M. a. J. Bullido, I. Sastre, M. a. Recuero, M. A. García, J. Aldudo, J. Vázquez and F. Valdivieso, *Allelic polymorphisms in the transcriptional*

- regulatory region of apolipoprotein e gene*, FEBS letters **421** (1998), no. 2, 105-108.
18. Y. Namba, M. Tomonaga, H. Kawasaki, E. Otomo and K. Ikeda, *Apolipoprotein e immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in creutzfeldt-jakob disease*, Brain research **541** (1991), no. 1, 163-166.
 19. W. J. Strittmatter, A. M. Saunders, D. Schmechel, M. Pericak-Vance, J. Enghild, G. S. Salvesen and A. D. Roses, *Apolipoprotein e: High-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial alzheimer disease*, Proceedings of the National Academy of Sciences **90** (1993), no. 5, 1977-1981.
 20. Y. Huang, K. H. Weisgraber, L. Mucke and R. W. Mahley, *Apolipoprotein e*, Journal of Molecular Neuroscience **23** (2004), no. 3, 189-204.
 21. E. H. Corder, A. M. Saunders, W. J. Strittmatter, D. E. Schmechel, P. C. Gaskell, G. a. Small, A. D. Roses, J. L. Haines and M. A. Pericak-Vance, *Gene dose of apolipoprotein e type 4 allele and the risk of alzheimer's disease in late onset families*, Science **261** (1993), no. 5123, 921-923.
 22. C. T. Liverman, K. Yaffe and D. G. Blazer, *Cognitive aging: Progress in understanding and opportunities for action*, National Academies Press 2015.
 23. I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Y. C. Tung, M. Quinlan, H. M. Wisniewski and L. I. Binder, *Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in alzheimer cytoskeletal pathology*, Proceedings of the National Academy of Sciences **83** (1986), no. 13, 4913-4917.
 24. W. Spielmeier, *Histopathologie des nervensystems*, vol. 1, J. Springer 1922.
 25. K. S. Kosik, C. L. Joachim and D. J. Selkoe, *Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in alzheimer disease*, Proceedings of the National Academy of Sciences **83** (1986), no. 11, 4044-4048.
 26. K. Iqbal, T. Zaidi, G. Wen, I. Grundke-Iqbal, P. Merz, S. Shaikh, H. Wisniewski, I. Alafuzoff and B. Winblad, *Defective brain microtubule assembly in alzheimer's disease*, The Lancet **328** (1986), no. 8504, 421-426.
 27. D. C. Ryman, N. Acosta-Baena, P. S. Aisen, T. Bird, A. Danek, N. C. Fox, A. Goate, P. Frommelt, B. Ghetti, J. B. S. Langbaum, F. Lopera, R. Martins, C. L. Masters, R. P. Mayeux, E. McDade, S. Moreno, E. M. Reiman, J. M. Ringman,

- S. Salloway, P. R. Schofield, R. Sperling, P. N. Tariot, C. Xiong, J. C. Morris, R. J. Bateman and N. And the Dominantly Inherited Alzheimer, *Symptom onset in autosomal dominant alzheimer disease: A systematic review and meta-analysis*, *Neurology* **83** (2014), no. 3, 253-260.
28. A. Himmler, D. Drechsel, M. W. Kirschner and D. W. Martin, *Tau consists of a set of proteins with repeated c-terminal microtubule-binding domains and variable n-terminal domains*, *Molecular and cellular biology* **9** (1989), no. 4, 1381-1388.
 29. J. F. McCarter, S. Liebscher, T. Bachhuber, C. Abou-Ajram, M. Hübener, B. T. Hyman, C. Haass and M. Meyer-Luehmann, *Clustering of plaques contributes to plaque growth in a mouse model of alzheimer's disease*, *Acta Neuropathologica* **126** (2013), no. 2, 179-188.
 30. Q. Guo, Z. Wang, H. Li, M. Wiese and H. Zheng, *App physiological and pathophysiological functions: Insights from animal models*, *Cell Research* **22** (2012), no. 1, 78-89.
 31. S. Ring, S. W. Weyer, S. B. Kilian, E. Waldron, C. U. Pietrzik, M. A. Filippov, J. Herms, C. Buchholz, C. B. Eckman and M. Korte, *The secreted β -amyloid precursor protein ectodomain app_s is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of app-deficient mice*, *Journal of Neuroscience* **27** (2007), no. 29, 7817-7826.
 32. C. Priller, T. Bauer, G. Mitteregger, B. Krebs, H. A. Kretschmar and J. Herms, *Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein*, *The Journal of Neuroscience* **26** (2006), no. 27, 7212.
 33. D. C. Lu, S. Rabizadeh, S. Chandra, R. F. Shayya, L. M. Ellerby, X. Ye, G. S. Salvesen, E. H. Koo and D. E. Bredesen, *A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid β -protein precursor*, *Nature medicine* **6** (2000), no. 4.
 34. J. Nunan and D. H. Small, *Regulation of app cleavage by α -, β -and γ -secretases*, *FEBS letters* **483** (2000), no. 1, 6-10.
 35. S. Shah, S.-F. Lee, K. Tabuchi, Y.-H. Hao, C. Yu, Q. LaPlant, H. Ball, C. E. Dann Iii, T. Südhof and G. Yu, *Nicastrin functions as a γ -secretase-substrate receptor*, *Cell* **122** (2005), no. 3, 435-447.
 36. N. Susuki, T. T. Cheung, X. D. Cai, A. Odaka, L. Otvos, C. Eckman, T. Golde and S. G. Younkin, *An increased percentage of long amyloid b protein secreted*

- by familial amyloid b protein precursor (bapp717) mutants, *Science* **264** (1994), 1336-1340.
37. D. B. Carter, E. Dunn, A. M. Pauley, D. D. McKinley, T. J. Fleck, B. R. Ellerbrook, N. C. Stratman, X. Zhou, C. S. Himes, J. S. Nye, A. Tomasselli and R. Yan, *Changes in γ -secretase activity and specificity caused by the introduction of consensus aspartyl protease active motif in presenilin 1*, *Molecular Neurodegeneration* **3** (2008), no. 1, 6.
 38. P. Picone, D. Nuzzo, L. Caruana, V. Scafidi and M. Di Carlo, *Mitochondrial dysfunction: Different routes to alzheimer's disease therapy*, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2014** (2014), 11.
 39. C. Haass, M. G. Schlossmacher, A. Y. Hung, C. Vigo-Pelfrey, A. Mellon, B. L. Ostaszewski, I. Lieberburg, E. H. Koo, D. Schenk and D. B. Teplow, *Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism*, *Nature* **359** (1992), no. 6393, 322-325.
 40. G.-f. Chen, T.-h. Xu, Y. Yan, Y.-r. Zhou, Y. Jiang, K. Melcher and H. E. Xu, *Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development*, *Acta Pharmacol Sin* **38** (2017), no. 9, 1205-1235.
 41. O. N. Antzutkin, J. J. Balbach, R. D. Leapman, N. W. Rizzo, J. Reed and R. Tycko, *Multiple quantum solid-state nmr indicates a parallel, not antiparallel, organization of β -sheets in alzheimer's β -amyloid fibrils*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97** (2000), no. 24, 13045-13050.
 42. B. Soreghan, J. Kosmoski and C. Glabe, *Surfactant properties of alzheimer's a beta peptides and the mechanism of amyloid aggregation*, *Journal of Biological Chemistry* **269** (1994), no. 46, 28551-28554.
 43. M. R. Nichols, M. A. Moss, D. K. Reed, W.-L. Lin, R. Mukhopadhyay, J. H. Hoh and T. L. Rosenberry, *Growth of β -amyloid (1– 40) protofibrils by monomer elongation and lateral association. Characterization of distinct products by light scattering and atomic force microscopy*, *Biochemistry* **41** (2002), no. 19, 6115-6127.
 44. A. M. D'Ursi, M. R. Armenante, R. Guerrini, S. Salvadori, G. Sorrentino and D. Picone, *Solution structure of amyloid β -peptide (25–35) in different media*, *Journal of Medicinal Chemistry* **47** (2004), no. 17, 4231-4238.
 45. O. Crescenzi, S. Tomaselli, R. Guerrini, S. Salvadori, A. M. D'Ursi, P. A. Temussi and D. Picone, *Solution structure of the alzheimer amyloid β -peptide*

- (1–42) in an apolar microenvironment, *European Journal of Biochemistry* **269** (2002), no. 22, 5642-5648.
46. Y.-q. Liu, M.-q. Jia, Z.-h. Xie, X.-f. Liu, Y. Hui, X.-l. Zheng, H.-q. Yuan and J.-z. Bi, *Arrestins contribute to amyloid beta-induced cell death via modulation of autophagy and the $\alpha 7$ nAch receptor in sh-sy5y cells*, *Scientific Reports* **7** (2017), 3446.
 47. G. Shanmugam and R. Jayakumar, *Structural analysis of amyloid β peptide fragment (25–35) in different microenvironments*, *Peptide Science* **76** (2004), no. 5, 421-434.
 48. K. Herrup, *Reimagining alzheimer's disease—an age-based hypothesis*, *The Journal of Neuroscience* **30** (2010), no. 50, 16755.
 49. M. P. Mattson, *Pathways towards and away from alzheimer's disease*, *Nature* **430** (2004), no. 7000, 631-639.
 50. F. Di Domenico, E. Barone, M. Perluigi and D. A. Butterfield, *The triangle of death in alzheimer's disease brain: The aberrant cross-talk among energy metabolism, mammalian target of rapamycin signaling, and protein homeostasis revealed by redox proteomics*, *Antioxidants & redox signaling* **26** (2017), no. 8, 364-387.
 51. Y. Ihara, M. Morishima-Kawashima and R. Nixon, *The ubiquitin–proteasome system and the autophagic–lysosomal system in alzheimer disease*, *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2** (2012), no. 8, a006361.
 52. D. A. Butterfield and E. R. Stadtman, "Chapter 7 protein oxidation processes in aging brain," *Advances in cell aging and gerontology*, P. S. Timiras and E. E. Bittar (Editors), vol. 2, Elsevier 1997, pp. 161-191.
 53. B. S. Berlett and E. R. Stadtman, *Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress*, *Journal of Biological Chemistry* **272** (1997), no. 33, 20313-20316.
 54. R. L. Levine, *Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease*^{2,3} 2guest editor: Earl stadtmann 3this article is part of a series of reviews on "oxidatively modified proteins in aging and disease." the full list of papers may be found on the homepage of the journal, *Free Radical Biology and Medicine* **32** (2002), no. 9, 790-796.
 55. Y. J. Suzuki, M. Carini and D. A. Butterfield, *Protein carbonylation*, *Antioxidants & redox signaling* **12** (2010), no. 3, 323-325.

56. D. A. Butterfield, T. T. Reed, M. Perluigi, C. De Marco, R. Coccia, J. N. Keller, W. R. Markesbery and R. Sultana, *Elevated levels of 3-nitrotyrosine in brain from subjects with amnesic mild cognitive impairment: Implications for the role of nitration in the progression of alzheimer's disease*, Brain Research **1148** (2007), no. Supplement C, 243-248.
57. D. A. Butterfield, L. Gu, F. D. Domenico and R. A. S. Robinson, *Mass spectrometry and redox proteomics: Applications in disease*, Mass Spectrometry Reviews **33** (2014), no. 4, 277-301.
58. H. Braak and E. Braak, *Neuropathological staging of alzheimer-related changes*, Acta Neuropathologica **82** (1991), no. 4, 239-259.
59. E. Tamagno, M. Parola, P. Bardini, A. Piccini, R. Borghi, M. Guglielmotto, G. Santoro, A. Davit, O. Danni, M. A. Smith, G. Perry and M. Tabaton, *B-site app cleaving enzyme up-regulation induced by 4-hydroxynonenal is mediated by stress-activated protein kinases pathways*, Journal of Neurochemistry **92** (2005), no. 3, 628-636.
60. M. A. Lovell, S. Xiong, C. Xie, P. Davies and W. R. Markesbery, *Induction of hyperphosphorylated tau in primary rat cortical neuron cultures mediated by oxidative stress and glycogen synthase kinase-3*, Journal of Alzheimer's Disease **6** (2004), no. 6, 659-671.
61. R. L. Levine, J. Moskowitz and E. R. Stadtman, *Oxidation of methionine in proteins: Roles in antioxidant defense and cellular regulation*, IUBMB Life **50** (2000), no. 4-5, 301-307.
62. E. R. Stadtman, H. Van Remmen, A. Richardson, N. B. Wehr and R. L. Levine, *Methionine oxidation and aging*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics **1703** (2005), no. 2, 135-140.
63. J. X. Chen and S. D. Yan, *Amyloid- β -induced mitochondrial dysfunction*, Journal of Alzheimer's Disease **12** (2007), no. 2, 177-184.
64. J. X. Chen and S. S. Yan, *Role of mitochondrial amyloid- β in alzheimer's disease*, Journal of Alzheimer's Disease **20** (2010), no. S2, 569-578.
65. M. Di Carlo, D. Giacomazza, P. Picone, D. Nuzzo and P. L. San Biagio, *Are oxidative stress and mitochondrial dysfunction the key players in the neurodegenerative diseases?*, Free Radical Research **46** (2012), no. 11, 1327-1338.

66. P. Picone, M. L. Bondi, P. Picone, M. L. Bondi, G. Montana, A. Bruno, G. Pitarresi, G. Giammona and M. Di Carlo, *Ferulic acid inhibits oxidative stress and cell death induced by ab oligomers: Improved delivery by solid lipid nanoparticles*, Free Radical Research **43** (2009), no. 11, 1133-1145.
67. L.-M. Chua, M.-L. Lim and B.-S. Wong, *The kunitz-protease inhibitor domain in amyloid precursor protein reduces cellular mitochondrial enzymes expression and function*, Biochemical and Biophysical Research Communications **437** (2013), no. 4, 642-647.
68. M. Manczak, M. J. Calkins and P. H. Reddy, *Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein drp1 in neurons from patients with alzheimer's disease: Implications for neuronal damage*, Human Molecular Genetics **20** (2011), no. 13, 2495-2509.
69. M. Manczak and P. H. Reddy, *Abnormal interaction between the mitochondrial fission protein drp1 and hyperphosphorylated tau in alzheimer's disease neurons: Implications for mitochondrial dysfunction and neuronal damage*, Human Molecular Genetics **21** (2012), no. 11, 2538-2547.
70. H. Du, L. Guo, F. Fang, D. Chen, A. A Sosunov, G. M McKhann, Y. Yan, C. Wang, H. Zhang, J. D. Molkenin, F. J. Gunn-Moore, J. P. Vonsattel, O. Arancio, J. X. Chen and S. D. Yan, *Cyclophilin d deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in alzheimer's disease*, **14** (2008), 1097.
71. L. G. Friedman, Y. H. Qureshi and W. H. Yu, *Promoting autophagic clearance: Viable therapeutic targets in alzheimer's disease*, Neurotherapeutics **12** (2015), no. 1, 94-108.
72. A. R. J. Young, E. Y. W. Chan, X. W. Hu, R. Köchl, S. G. Crawshaw, S. High, D. W. Hailey, J. Lippincott-Schwartz and S. A. Tooze, *Starvation and ulk1-dependent cycling of mammalian atg9 between the tgn and endosomes*, Journal of Cell Science **119** (2006), no. 18, 3888.
73. T. Hara, K. Nakamura, M. Matsui, A. Yamamoto, Y. Nakahara, R. Suzuki-Migishima, M. Yokoyama, K. Mishima, I. Saito, H. Okano and N. Mizushima, *Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice*, Nature **441** (2006), no. 7095, 885-889.
74. A. Caccamo, M. A. Maldonado, S. Majumder, D. X. Medina, W. Holbein, A. Magrí and S. Oddo, *Naturally secreted amyloid- β increases mammalian target*

- of rapamycin (mTOR) activity via a p70S6-mediated mechanism, *Journal of Biological Chemistry* **286** (2011), no. 11, 8924-8932.
75. M. E. Orr and S. Oddo, *Autophagic/lysosomal dysfunction in Alzheimer's disease*, *Alzheimer's Research & Therapy* **5** (2013), no. 5, 53.
 76. Z. Cai, B. Zhao, K. Li, L. Zhang, C. Li, S. H. Quazi and Y. Tan, *Mammalian target of rapamycin: A valid therapeutic target through the autophagy pathway for Alzheimer's disease?*, *Journal of Neuroscience Research* **90** (2012), no. 6, 1105-1118.
 77. W. H. Yu, A. M. Cuervo, A. Kumar, C. M. Peterhoff, S. D. Schmidt, J.-H. Lee, P. S. Mohan, M. Mercken, M. R. Faruqi and L. O. Tjernberg, *Macroautophagy—a novel β -amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease*, *J Cell Biol* **171** (2005), no. 1, 87-98.
 78. R. A. Nixon, J. Wegiel, A. Kumar, W. H. Yu, C. Peterhoff, A. Cataldo and A. M. Cuervo, *Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: An immunoelectron microscopy study*, *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **64** (2005), no. 2, 113-122.
 79. S. Fan, B. Zhang, P. Luan, B. Gu, Q. Wan, X. Huang, W. Liao and J. Liu, *Pi3k/akt/mTOR/p70S6 pathway is involved in A β 25-35-induced autophagy*, *BioMed research international* **2015** (2015).
 80. X. Meng, M. Wang, G. Sun, J. Ye, Y. Zhou, X. Dong, T. Wang, S. Lu and X. Sun, *Attenuation of A β 25–35-induced parallel autophagic and apoptotic cell death by gypenoside XVII through the estrogen receptor-dependent activation of Nrf2/ARE pathways*, *Toxicology and Applied Pharmacology* **279** (2014), no. 1, 63-75.
 81. D. Goyal, S. Shuaib, S. Mann and B. Goyal, *Rationally designed peptides and peptidomimetics as inhibitors of amyloid- β (A β) aggregation: Potential therapeutics of Alzheimer's disease*, *ACS Combinatorial Science* **19** (2017), no. 2, 55-80.
 82. L. O. Tjernberg, J. Näslund, F. Lindqvist, J. Johansson, A. R. Karlström, J. Thyberg, L. Terenius and C. Nordstedt, *Arrest of amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand*, *Journal of Biological Chemistry* **271** (1996), no. 15, 8545-8548.

83. J. Kumar, R. Namsechi and V. L. Sim, *Structure-based peptide design to modulate amyloid beta aggregation and reduce cytotoxicity*, PLOS ONE **10** (2015), no. 6, e0129087.
84. S. Sinha, D. H. J. Lopes and G. Bitan, *A key role for lysine residues in amyloid β -protein folding, assembly, and toxicity*, ACS Chemical Neuroscience **3** (2012), no. 6, 473-481.
85. X.-L. Dai, Y.-X. Sun and Z.-F. Jiang, *Attenuated cytotoxicity but enhanced β fibril of a mutant amyloid β -peptide with a methionine to cysteine substitution*, FEBS Letters **581** (2007), no. 7, 1269-1274.
86. J. Lee, I. Kwon, S. S. Jang and A. E. Cho, *Investigation of the effect of erythrosine b on amyloid beta peptide using molecular modeling*, Journal of Molecular Modeling **22** (2016), no. 4, 92.
87. A. E. Estrada-Rodríguez, "Caracterización in vitro y efecto en cultivo celular de variantes en la agregación del péptido ab " *Bioquímica y medicina molecular*, vol. Master of science Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, 2016, p. 119.
88. J. Talafous, K. J. Marciniowski, G. Klopman and M. G. Zagorski, *Solution structure of residues 1-28 of the amyloid beta-peptide*, Biochemistry **33** (1994), no. 25, 7788-7796.
89. C. J. Pike, A. J. Walencewicz-Wasserman, J. Kosmoski, D. H. Cribbs, C. G. Glabe and C. W. Cotman, *Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: Contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity*, J Neurochem **64** (1995), no. 1, 253-265.
90. M. Sublimi Saponetti, M. Grimaldi, M. Scrima, C. Albonetti, S. L. Nori, A. Cucolo, F. Bobba and A. M. D'Ursi, *Aggregation of $\alpha\beta(25-35)$ on dopc and dopc/dha bilayers: An atomic force microscopy study*, PLoS One **9** (2014), no. 12, e115780.
91. Y. Song, P. Li, L. Liu, C. Bortolini and M. Dong, *Nanostructural differentiation and toxicity of amyloid- β 25-35 aggregates ensue from distinct secondary conformation*, Scientific Reports **8** (2018), no. 1, 765.
92. R. J. Chalifour, R. W. McLaughlin, L. Lavoie, C. Morissette, N. Tremblay, M. Boulé, P. Sarazin, D. Stéa, D. Lacombe, P. Tremblay and F. Gervais, *Stereoselective interactions of peptide inhibitors with the beta-amyloid peptide*, J Biol Chem **278** (2003), no. 37, 34874-34881.

93. M. Cruz, J. M. Tusell, D. Grillo-Bosch, F. Albericio, J. Serratosa, F. Rabanal and E. Giralt, *Inhibition of beta-amyloid toxicity by short peptides containing n-methyl amino acids*, J Pept Res **63** (2004), no. 3, 324-328.
94. B. Matharu, O. El-Agnaf, A. Razvi and B. M. Austen, *Development of retro-inverso peptides as anti-aggregation drugs for β -amyloid in alzheimer's disease*, Peptides **31** (2010), no. 10, 1866-1872.
95. L. O. Tjernberg, C. Lilliehöök, D. J. Callaway, J. Näslund, S. Hahne, J. Thyberg, L. Terenius and C. Nordstedt, *Controlling amyloid beta-peptide fibril formation with protease-stable ligands*, J Biol Chem **272** (1997), no. 19, 12601-12605.
96. A. E. Estrada-Rodríguez, D. Valdez-Pérez, J. Ruiz-García, A. Treviño-Garza, A. M. Gómez-Martínez, H. G. Martínez-Rodríguez, A. M. Rivas-Estilla, R. Vidaltamayo and V. Zomosa-Signoret, *Effects of single amino acid substitutions on aggregation and cytotoxicity properties of amyloid β peptide*, International Journal of Peptide Research and Therapeutics (2018).
97. S. Varadarajan, S. Yatin, J. Kanski, F. Jahanshahi and D. A. Butterfield, *Methionine residue 35 is important in amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress*, Brain Res Bull **50** (1999), no. 2, 133-141.
98. J. Kanski, M. Aksenova, C. Schöneich and D. A. Butterfield, *Substitution of isoleucine-31 by helical-breaking proline abolishes oxidative stress and neurotoxic properties of alzheimer's amyloid beta-peptide*, Free Radic Biol Med **32** (2002), no. 11, 1205-1211.
99. E. Wesén, G. D. M. Jeffries, M. Matson Dzebo and E. K. Esbjörner, *Endocytic uptake of monomeric amyloid- β peptides is clathrin- and dynamin-independent and results in selective accumulation of $a\beta(1-42)$ compared to $a\beta(1-40)$* , Scientific Reports **7** (2017), 2021.
100. T. Kim, G. S. Vidal, M. Djuricic, C. M. William, M. E. Birnbaum, K. C. Garcia, B. T. Hyman and C. J. Shatz, *Human *lilrb2* is a β -amyloid receptor and its murine homolog *pirb* regulates synaptic plasticity in an alzheimer's model*, Science (New York, N.Y.) **341** (2013), no. 6152, 10.1126/science.1242077.
101. L. Millucci, L. Ghezzi, G. Bernardini and A. Santucci, *Conformations and biological activities of amyloid beta peptide 25-35*, Curr Protein Pept Sci **11** (2010), no. 1, 54-67.

102. N. Kandel, T. Zheng, Q. Huo and S. A. Tatulian, *Membrane binding and pore formation by a cytotoxic fragment of amyloid β peptide*, The Journal of Physical Chemistry B **121** (2017), no. 45, 10293-10305.
103. M. Mainardi, A. Di Garbo, M. Caleo, N. Berardi, A. Sale and L. Maffei, *Environmental enrichment strengthens corticocortical interactions and reduces amyloid- β oligomers in aged mice*, Frontiers in Aging Neuroscience **6** (2014), 1.
104. E. C. Gunther and S. M. Strittmatter, *B-amyloid oligomers and cellular prion protein in alzheimer's disease*, Journal of molecular medicine (Berlin, Germany) **88** (2010), no. 4, 331-338.
105. S. Lesne, M. T. Koh, L. Kotilinek, R. Kaye, C. G. Glabe, A. Yang, M. Gallagher and K. H. Ashe, *A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory*, Nature **440** (2006), no. 7082, 352-357.
106. D. J. Selkoe, *Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior*, Behav Brain Res **192** (2008), no. 1, 106-113.
107. D. M. Walsh, I. Klyubin, J. V. Fadeeva, W. K. Cullen, R. Anwyl, M. S. Wolfe, M. J. Rowan and D. J. Selkoe, *Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo*, Nature **416** (2002), no. 6880, 535-539.
108. J. P. Cleary, D. M. Walsh, J. J. Hofmeister, G. M. Shankar, M. A. Kuskowski, D. J. Selkoe and K. H. Ashe, *Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function*, Nat Neurosci **8** (2005), no. 1, 79-84.
109. G. M. Shankar, S. Li, T. H. Mehta, A. Garcia-Munoz, N. E. Shepardson, I. Smith, F. M. Brett, M. A. Farrell, M. J. Rowan, C. A. Lemere, C. M. Regan, D. M. Walsh, B. L. Sabatini and D. J. Selkoe, *Amyloid-beta protein dimers isolated directly from alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory*, Nat Med **14** (2008), no. 8, 837-842.
110. A. Noguchi, S. Matsumura, M. Dezawa, M. Tada, M. Yanazawa, A. Ito, M. Akioka, S. Kikuchi, M. Sato, S. Ideno, M. Noda, A. Fukunari, S. Muramatsu, Y. Itokazu, K. Sato, H. Takahashi, D. B. Teplow, Y. Nabeshima, A. Kakita, K. Imahori and M. Hoshi, *Isolation and characterization of patient-derived, toxic, high mass amyloid beta-protein (abeta) assembly from alzheimer disease brains*, J Biol Chem **284** (2009), no. 47, 32895-32905.

111. T. J. Esparza, N. C. Wildburger, H. Jiang, M. Gangolli, N. J. Cairns, R. J. Bateman and D. L. Brody, *Soluble amyloid-beta aggregates from human alzheimer's disease brains*, Scientific Reports **6** (2016), 38187.
112. J. M. Mc Donald, T. T. O'Malley, W. Liu, A. J. Mably, G. Brinkmalm, E. Portelius, W. M. Wittbold, 3rd, M. P. Frosch and D. M. Walsh, *The aqueous phase of alzheimer's disease brain contains assemblies built from approximately 4 and approximately 7 kda abeta species*, Alzheimers Dement **11** (2015), no. 11, 1286-1305.
113. M. E. Clementi, S. Marini, M. Coletta, F. Orsini, B. Giardina and F. Misiti, *Abeta(31-35) and abeta(25-35) fragments of amyloid beta-protein induce cellular death through apoptotic signals: Role of the redox state of methionine-35*, FEBS Lett **579** (2005), no. 13, 2913-2918.
114. D. T. Loo, A. Copani, C. J. Pike, E. R. Whittemore, A. J. Walencewicz and C. W. Cotman, *Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons*, Proceedings of the National Academy of Sciences **90** (1993), no. 17, 7951.
115. G. Forloni, R. Chiesa, S. Smioldo, L. Verga, M. Salmona, F. Tagliavini and N. Angeretti, *Apoptosis mediated neurotoxicity induced by chronic application of beta amyloid fragment 25-35*, Neuroreport **4** (1993), no. 5, 523-526.
116. J. Li, X. Ji, J. Zhang, G. Shi, X. Zhu and K. Wang, *Original article
paeoniflorin attenuates a β ₂₅₋₃₅-induced neurotoxicity in pc12 cells by preventing mitochondrial dysfunction*, Folia Neuropathologica **52** (2014), no. 3, 285-290.
117. V. Lahmy, R. Long, D. Morin, V. Villard and T. Maurice, *Mitochondrial protection by the mixed muscarinic/sigma1 ligand anavex2-73, a tetrahydrofuran derivative, in abeta25-35 peptide-injected mice, a nontransgenic alzheimer's disease model*, Front Cell Neurosci **8** (2014), 463.
118. L. Li, J. Du, L. Zou, H. Xia, T. Wu, Y. Kim and Y. Lee, *The neuroprotective effects of decursin isolated from angelica gigas nakai against amyloid beta-protein-induced apoptosis in pc 12 cells via a mitochondria-related caspase pathway*, Neurochem Res **40** (2015), no. 8, 1555-1562.
119. M. Garcia-Arencibia, W. E. Hochfeld, P. P. Toh and D. C. Rubinsztein, *Autophagy, a guardian against neurodegeneration*, Semin Cell Dev Biol **21** (2010), no. 7, 691-698.

120. K. Hensley and M. E. Harris-White, *Redox regulation of autophagy in healthy brain and neurodegeneration*, *Neurobiol Dis* **84** (2015), 50-59.
121. S. Ghavami, S. Shojaei, B. Yeganeh, S. R. Ande, J. R. Jangamreddy, M. Mehrpour, J. Christoffersson, W. Chaabane, A. R. Moghadam, H. H. Kashani, M. Hashemi, A. A. Owji and M. J. Los, *Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders*, *Prog Neurobiol* **112** (2014), 24-49.
122. M. Kadowaki and M. R. Karim, "Chapter 13 cytosolic lc3 ratio as a quantitative index of macroautophagy," *Methods in enzymology*, vol. 452, Academic Press 2009, pp. 199-213.
123. N. Mizushima and T. Yoshimori, *How to interpret lc3 immunoblotting*, *Autophagy* **3** (2007), no. 6, 542-545.
124. A. Streeter, F. M. Menzies and D. C. Rubinsztein, "Lc3-ii tagging and western blotting for monitoring autophagic activity in mammalian cells," *Systems biology of alzheimer's disease*, J. I. Castrillo and S. G. Oliver (Editors), Springer New York, New York, NY, 2016, pp. 161-170.
125. F. Di Domenico, R. Coccia, A. Cocciolo, M. P. Murphy, G. Cenini, E. Head, D. A. Butterfield, A. Giorgi, M. E. Schinina, C. Mancuso, C. Cini and M. Perluigi, *Impairment of proteostasis network in down syndrome prior to the development of alzheimer's disease neuropathology: Redox proteomics analysis of human brain*, *Biochim Biophys Acta* **1832** (2013), no. 8, 1249-1259.
126. R. A. Nixon, *Autophagy, amyloidogenesis and alzheimer disease*, *J Cell Sci* **120** (2007), no. Pt 23, 4081-4091.
127. M. Perluigi, G. Pupo, A. Tramutola, C. Cini, R. Coccia, E. Barone, E. Head, D. A. Butterfield and F. Di Domenico, *Neuropathological role of pi3k/akt/mtor axis in down syndrome brain*, *Biochim Biophys Acta* **1842** (2014), no. 7, 1144-1153.
128. H. Wang, J. Ma, Y. Tan, Z. Wang, C. Sheng, S. Chen and J. Ding, *Amyloid-beta1-42 induces reactive oxygen species-mediated autophagic cell death in u87 and sh-sy5y cells*, *J Alzheimers Dis* **21** (2010), no. 2, 597-610.
129. I. Vivanco and C. L. Sawyers, *The phosphatidylinositol 3-kinase akt pathway in human cancer*, *Nat Rev Cancer* **2** (2002), no. 7, 489-501.
130. C. E. Pinzón, M. L. Serrano and M. C. Sanabria, *Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (pi3k/akt) en humanos*, *Revista Ciencias de la Salud* **7** (2009), 47-66.